



# THESE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse III - Paul Sabatier  
Discipline ou spécialité : *Biologie cellulaire et Biochimie*

---

Présentée et soutenue par M. POIROUX Guillaume  
Le 27 Mai 2011

Titre : *Evaluation du potentiel de lectines végétales dans le ciblage de médicaments anticancéreux: Application à la Photochimiothérapie*

---

### JURY

Dr. CHAPEROT Laurence (Directeur de Recherche, INSERM U823, Grenoble)  
Dr. FROCHOT Céline (Directeur de Recherche, LRGP ENSIC, Nancy)  
Pr. BARRE Annick (UMR 152 IRD-UPS, Toulouse)  
Pr. BENOIST Hervé (INSERM UMR1037, Toulouse)

### MEMBRES INVITÉS

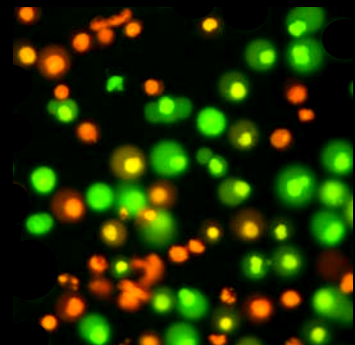
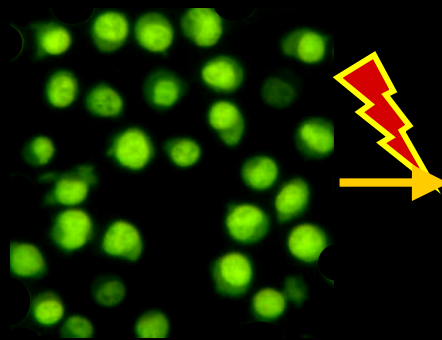
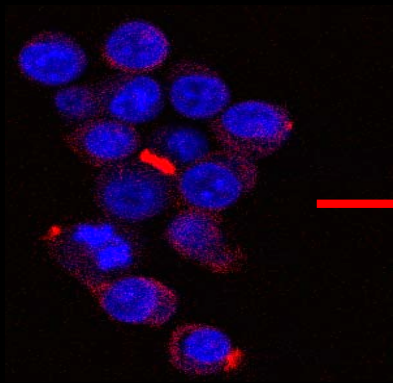
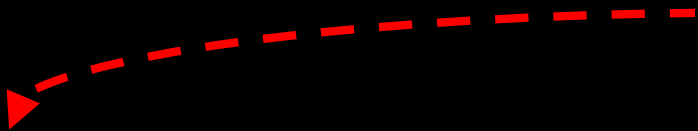
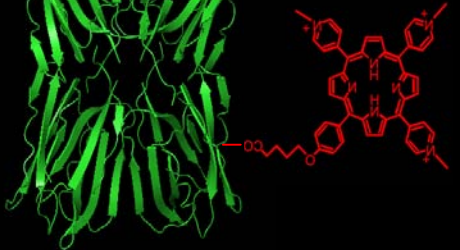
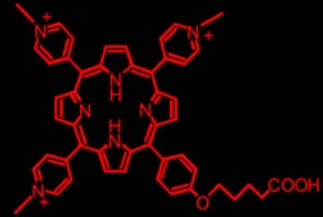
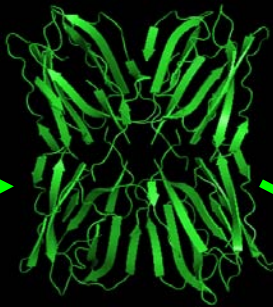
Dr. PIPY Bernard (Directeur de Recherche INSERM, UMR152 IRD-UPS, Toulouse)  
Dr. PITIE Marguerite (Chargé de Recherche 1 CNRS, LCC, Toulouse)

---

Ecole doctorale : *Biologie, Santé et Biotechnologies*  
Unité de recherche : *INSERM UMR1037, CRCT*  
Directeur(s) de Thèse : *BENOIST Hervé et BARRE Annick*  
Rapporteurs : *CHAPEROT Laurence et FROCHOT Céline*



# Du mûrier noir au ciblage en Photochimiothérapie anticancéreuse





## Remerciements:

Je tiens tout d'abord à dédier ce travail à mon grand-père Jean. Je remercie très fortement l'ensemble de ma famille, et en particulier mes parents et mon amie Maude pour leur soutien quotidien.

Ce travail a été réalisé en collaboration avec :

- l'équipe de recherche « sphingolipides, maladies chroniques et progression tumorale » de l'INSERM (UMR1037) dirigée par le Pr. Thierry Levade.

- l'équipe de recherche « Pro-Onco-Pharma » de l'IRD (UMR152) dirigée par le Pr. Annick Barre.

- l'équipe de recherche « Oxydation Biomimétiques » du CNRS (LCC) dirigée par le Pr. Geneviève Pratviel.

Je remercie l'ensemble des personnes de ces équipes qui m'ont permis de produire et d'étudier des conjugués covalents lectine-photosensibilisant en vue d'améliorer l'efficacité de la Photochimiothérapie anticancéreuse. Je remercie tous les étudiant(e)s : les Dr. Carmen Bedia et Anne Montfort, les futurs Dr. Sandrine Pélofy, Elodie Lafont, Virginie Albinet, Marie-Lise Bats, Leonardo Astudillo, Julia Rochotte, et Julie Haidar ; ainsi que tous les statutaires : le Pr. Bruno Ségui, les Dr. Nathalie Andrieux-Abadie et Frédérique Sabourdy, Nicole Therville, Virginie Garcia et Patricia Clavé.

Je remercie tout particulièrement mes directeurs de thèse : le Professeur Hervé Benoist qui a été mon mentor durant ces 3 ans et demi de doctorat, ainsi que le Pr. Annick Barre de m'avoir fait confiance pour le développement de ce projet. Un grand merci au Dr. Marguerite Pitié sans qui la production de conjugués covalents lectine-photosensibilisant n'aurait pas été possible. Je remercie très fortement le Dr. Emi Evangelio pour son investissement dans ce travail et pour ses qualités personnelles ainsi que le Dr. Jean-Philippe Borges pour son investissement. Je le remercie également de m'avoir formé pour « affronter » les oraux. Je remercie Stéphane Carpentier pour son soutien masculin dans l'équipe INSERM et pour ses qualités personnelles. Je remercie le Pr. Pierre Rougé ainsi que Raphaël Culerrier qui ont initié ce projet. J'adresse mes remerciements à toutes les personnes qui m'ont permis d'obtenir des prélèvements sanguins : les Pr. Cécile Demur, Joël-Xavier Corberrand, Patrick Laharrague, les infirmières Marie-Dominique Pinteaux et Christine Teisseire. Je remercie également les Dr. Alain Jauneau, Fatima-E. L'Faqihi-Olive, Valérie Duplan-Eche, Gisèle Borderies, Jean-Claude Thiers et Jean-Caude Lepert pour leur assistance technique.

Je remercie très fortement tous mes amis biologistes, Marina Garcia-Joves, Clara Burande, Romain Guiet et Rémi Peyraud, et, tous mes amis proches, Max et Hélène, Roro, Jean-Julien, Emile, Jordi, Damien et Julie, et, Baptiste et Elodie pour leur soutien.

Enfin, je remercie l'ensemble du jury de ma thèse, les Dr. Laurence Chaperot, Céline Frochot et Bernard Pipy, d'avoir accepté d'évaluer mon travail ainsi que pour leurs encouragements.

# RESUME

La photochimiothérapie (ou PCT) peut être utilisée pour le traitement de tumeurs solides (thérapie photodynamique ou PDT) ou pour le traitement *ex vivo* de différentes pathologies hématologiques (photochimiothérapie extracorporelle ou ECP), comme par exemple le lymphome de Sézary. Le développement de la PCT en oncologie demeure limité en raison de la faible sélectivité des photosensibilisants pour les cellules tumorales. Afin d'augmenter la biodisponibilité des photosensibilisants vis-à-vis des cellules cancéreuses, nous proposons d'utiliser des lectines végétales comme molécule vectrice. A côté des anticorps ou des peptides ciblant les cellules tumorales, les lectines peuvent être une approche complémentaire. En effet, certaines lectines reconnaissent des épitopes glycaniques préférentiellement exprimés par les cellules tumorales. De plus, certaines d'entre elles présentent des effets immunomodulateurs et/ou toxiques, induisant des effets anticancéreux directs (toxicité) ou indirects (immuno-modulation). Deux lectines extraites de l'écorce du mûrier noir *Morus nigra* semblent être particulièrement intéressantes. Il s'agit de Morniga G (MorG) et de Morniga M (MorM). Ces deux lectines présentent des spécificités glycaniques différentes. Alors que MorM est spécifique du mannose, MorG est spécifique du galactose. Cependant, des lectines présentant une spécificité de reconnaissance monosaccharidique identique peuvent interagir avec des oligosaccharides très différents et induire des effets biologiques distincts. Ainsi, la reconnaissance glycanique médiée par MorM pourrait être sensible à des altérations fines de la *N*-glycosylation. De même, MorG présente une forte affinité pour certains antigènes *O*-glycaniques associés aux tumeurs, tels que les antigènes T (CD176; Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ 1-O-Ser/Thr) et Tn (CD175; GalNAc $\alpha$ 1-O-Ser/Thr).

Dans un premier temps, les effets biologiques de ces deux lectines ont été évalués sur des lymphocytes sains et leucémiques. Elles présentent des effets immunomodulateurs sur les lymphocytes sains et induisent un effet toxique à plus forte dose sur les cellules leucémiques Jurkat. MorM pourrait interagir, en partie, avec la *N*-glycosylation de certains récepteurs de mort tels que Fas, tandis que MorG pourrait interagir avec la *O*-glycosylation d'autres récepteurs de mort comme TRAIL-R. Ainsi, ces deux lectines induiraient une mort cellulaire caspase-dépendante en activant des récepteurs de mort différents. De plus, après interaction avec les glycoconjugués membranaires, elles sont rapidement endocytées, ce qui peut, à des concentrations non toxiques, en faire des vecteurs intéressants pour faciliter la pénétration intracellulaire de médicaments.

Dans un second temps, un conjugué covalent de la lectine Morniga G et de la porphyrine [5-(4-(5-carboxy-1-butoxy)-phényl)-10,15,20-tris(4-*N*-méthyl)-pyridiniumyl)] (TrMPyP) a été préparé et caractérisé. La phototoxicité du conjugué TrMPyP-MorG a été évaluée contre la lignée leucémique lymphoïde Jurkat exprimant fortement l'antigène Tn. Le conjugué (1) est internalisé rapidement (5 min) par les cellules Jurkat, (2) augmente très fortement l'activité phototoxique de TrMPyP (DL50 de TrMPyP-MorG = 5 nM ; DL50 de TrMPyP = 15  $\mu$ M), par l'intermédiaire d'un processus dépendant de la *O*-glycosylation, (3) induit une mort cellulaire majoritairement caspase indépendante, (4) est capable d'éliminer spécifiquement les cellules leucémiques T Jurkat (Tn-positives) mélangées à des lymphocytes T sains (Tn-négatifs), en préservant le potentiel fonctionnel des lymphocytes sains. De façon intéressante, après irradiation, le conjugué TrMPyP-MorG est capable d'entraîner un effet phototoxique sur différentes lignées cellulaires leucémiques d'origine myéloïde ou lymphoïde et sur des cellules tumorales fraîches provenant de patients atteints de leucémies lymphoïdes aiguës ou chroniques.

Enfin, des photosensibilisants (activables dans le rouge) plus adaptés au traitement PDT de tumeurs solides ont été greffés sur la lectine MorG. Leur phototoxicité a été étudiée *in vitro* sur le modèle de cellules leucémiques Jurkat.

Les présentes observations démontrent la capacité des lectines végétales à cibler des altérations de la glycosylation à la surface de cellules tumorales et à augmenter l'activité phototoxiques des photosensibilisants dans le cadre de la photochimiothérapie, et en particulier de la photochimiothérapie extracorporelle des leucémies.

# ABSTRACT

Photochemotherapy is used both for solid tumors and in extracorporeal treatment of various hematologic disorders, such as Sezary lymphoma. Nevertheless, its development in oncology remains limited, because of the low selectivity of photosensitizers. To enhance photosensitizer selectivity towards human tumor cells, a plant lectin was used as a carrier to target tumor O-glycosylation alterations. Beside monoclonal antibodies or targeting peptides, plant lectins might be a complementary approach. Some lectins have the capability to specifically interact with tumor-associated carbohydrate antigens (TACAs). Moreover, some of them induce immunomodulatory and anticancer effects. Anticancer effects can be resume to indirect effects (such as anticancer immune activation) or direct effects (such cytotoxicity on tumor cells). Two Jacalin-Related Lectins (JRL) extracted from *Morus nigra* seem to be interesting for biomedical applications. Morniga G (MorG) is a galactose-specific lectin, and Morniga M (MorM) is mannose-specific. Although, MorM could interact with *N*-linked glycans, MorG could interact with *O*-linked glycans. Thus, MorG seems to be highly specific for TACAs T (CD176; Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ 1-*O*-Ser/Thr) and Tn (CD175; GalNAc $\alpha$ 1-*O*-Ser/Thr). These differential monosaccharidic-binding properties could induce different biological effects.

First, we have investigated biological effects of the two JRLs on healthy and leukemic lymphocytes. MorG and MorM induce immunomodulatory effects on healthy lymphocytes and cytotoxic effects at higher doses on Jurkat leukemic cells. MorM could interact with *N*-linked death receptors, such as Fas, and MorG could bind to *O*-linked death receptors, such as TRAIL-R. So, these lectins might induce caspase-dependent apoptotic process by activating different death receptors-mediated signaling. Thus, after membrane interaction, these lectins are rapidly endocytosed by cells, which at low doses, make them interesting targeting molecules to improve medicines efficacy.

On the other hand, a white-light activatable porphyrin, [5-(4-(5-carboxy-1-butoxy)-phenyl)-10,15,20-tris(4-*N*-methyl-pyridiniumyl)-porphyrin] (TrMPyP), was covalently linked to MorG. The conjugate was molecularly and biologically characterized. Its cytotoxicity was evaluated after photochemotherapy, using human lymphoid leukemia cells as a tumor cell model. Using Tn-positive (Jurkat lymphoid leukemia) cells, the conjugate (with a 1:1 photosensitizer:lectin ratio) (*i*) was quickly (5 min) taken-up; (*ii*) dramatically increased cytotoxicity upon irradiation (LD<sub>50</sub> = 5 nM) as compared to free photosensitizer (LD<sub>50</sub> = 15  $\mu$ M), through an *O*-glycan-dependent process; (*iii*) induced caspase-independent cell death; (*iv*) specifically purged tumor cells from a 1:1 mixture of Jurkat leukemia (Tn-positive) and healthy (Tn-negative) lymphocytes, preserving the activation potential of healthy lymphocytes. Finally, the effectiveness of the conjugate-mediated killing on various leukemic cell lines as well as human primary acute and chronic lymphoid leukemia cells correlates with the ability of the lectin to bind the cell surface antigens.

Lastly, different PS that are more adapted to solid tumors PDT treatment, i.e. activatable in the red wavelengths, were covalently linked to MorG. Their phototoxic activities were tested in vitro against Jurkat cell line. These conjugates were able to kill Jurkat cells when irradiated by red light.

The present observations demonstrate the potential of plant lectins to target glycan alterations on tumor cells and their ability to improve PS endocytosis and effectiveness in the field of extracorporeal photochemotherapy of leukemias.



# LISTE DES ABREVIATIONS

ADCC : Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity  
ADN : Acide Désoxyribonucléique  
AIF : Apoptosis Inducing Ligand  
AMM : Autorisation de Mise sur le Marché  
ARN : Acide Ribonucléique  
Asn : Asparagine  
ATP : Adénosine Triphosphate  
CDC : Complement-Dependent Cytotoxicity  
CMH : Complexe Majeur d’Histocompatibilité  
Cosmc : Core 1 Gal Tranferase Specific Molecular Chaperon  
CTL : Cytotoxic T Lymphocyte  
DC : Cellule Dendritique  
DISC : Death Inducing Signaling Complex  
Dol-P : Dolichol-phosphate  
ECP : Extracorporeal Photochemotherapy  
EGF : Epidermal Growth Factor  
EPR : Enhanced Permeability and Retention effect  
FADD : Fas-Associated protein with Death Domain  
FDA : Food and Drug Agency  
Frc : Fructose  
Gal : Galactose  
GalNAc : N-acétyl galactosamine  
GAG : Glycosaminoglycane  
GDP : Guanosine Diphosphate  
Glc : Glucose  
GlcNAc : N-acétyl glucosamine  
GVHD : Graft Versus Host Disease  
HIV-1 : Human Immunodeficiency Virus 1  
Hp/HpD : Hematoporphyrin / Hematoporphyrin Derivative  
HPLC : High Performance Liquid Chromatography  
Hsp : Heat Shock Protein  
KLH : Key-hole Limpet Hemocyanin

LDL : Low Density Lipoprotein  
MAb : Monoclonal Antibody  
Man : Mannose  
NLS : Nuclear Localization Signal  
NST : Nucleotide Sugar Transporter  
PCD : Programmed Cell Death  
PCT : Photochimiothérapie  
PDT : Photodynamic Therapy  
pp $\alpha$ GalNAcT : polypeptide N-acétylgalactosamine transférase (pgant)  
PS : Photosensibilisant  
RE : Réticulum endoplasmique  
ROS : Radical Oxygen Species  
Ser : Sérine  
TACA : Tumor Associated Carbohydrate Antigen  
Thr : Thréonine  
TNF : Tumor Necrosis Factor  
TRAIL : TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand  
UV-A : Ultraviolet A  
VNTR : Variable Number Tandem Repeat  
z-VAD : Benzyloxycarbonyl Valyl-Alanyl-Aspartyl-(O-methyl)-fluoromethylketone

# SOMMAIRE

<b>I- REVUE GENERALE-----</b>	<b>15</b>
<b>Introduction : -----</b>	<b>17</b>
<b>I-1 La glycosylation : -----</b>	<b>19</b>
I-1-1 Structure et biosynthèse :-----	19
I-1-1-1 La N-glycosylation : -----	21
I-1-1-2 La O-glycosylation : -----	23
I-1-1-3 Contrôle de la O-glycosylation : -----	26
I-1-2 Glycosylation et fonctions associées :-----	26
I-1-2-1 Adhésion et reconnaissance : -----	27
I-1-2-2 Trafic et localisation des protéines : -----	29
I-1-2-3 Activation et mort cellulaire :-----	29
I-1-3 O-Glycosylation et cancer : -----	30
I-1-3-1 Expression des antigènes T, Tn et sialyl-Tn: -----	31
I-1-3-2 Antigènes glycaniques associés aux tumeurs et vaccination antitumorale : -----	33
<b>I-2 Les lectines végétales -----</b>	<b>35</b>
I-2-1 Présentation -----	35
I-2-1-1 Historique :-----	35
I-2-1-2 Classification :-----	36
I-2-1-3 Les lectines : protéines de reconnaissance glycanique :-----	38
I-2-1-4 Fonctions chez les végétaux :-----	38
I-2-2 Lectines végétales et cancer : -----	39
I-2-2-1 Effets toxiques et immunomodulateurs :-----	39
I-2-2-1-1 Les lectines de légumineuses -----	43
I-2-2-1-2 Les RIP de type II : -----	43
I-2-2-1-3 Les lectines liant la chitine : -----	44
I-2-2-1-4 Les lectines du mûrier noir ou Morus nigra :-----	44
I-2-2-2 Vectorisation de molécules anti-cancéreuses : -----	50
<b>I-3 La Photochimiothérapie ou PCT -----</b>	<b>52</b>
I-3-1 Généralités :-----	52
I-3-1-1 Historique de la PCT : -----	54
I-3-1-2 Photochimiothérapie et cancer : -----	55
I-3-1-2-1 La thérapie photodynamique anti-cancéreuse :-----	55
I-3-1-2-2 La photochimiothérapie extracorporelle :-----	56
I-3-2 Les photosensibilisants :-----	57
I-3-3 Mécanisme d'action de la PCT : -----	60
I-3-3-1 La photo-activation dans le visible : -----	60
I-3-3-2 Mécanismes cellulaires induits par la PDT: -----	63
I-3-3-2-1 PDT et apoptose des cellules cancéreuses :-----	64
I-3-3-2-2 PDT et autophagie des cellules cancéreuses : -----	66
I-3-3-2-3 PDT et nécrose des cellules cancéreuses : -----	66
I-3-3-3 Mécanismes cellulaires induits par l'ECP:-----	67
I-3-3-4 Autres cibles cellulaires de la PCT : effets indirects-----	68
I-3-3-4 -1 Cytotoxicité au niveau de la vascularisation de la tumeur :-----	69
I-3-3-4 -2 Activation des défenses immunes : -----	69
I-3-4 Ciblage des PS : -----	69
I-3-4-1 Ciblage passif : -----	70
I-3-4-2 Ciblage actif :-----	71
I-3-4-2-1 Structures moléculaires « simples » :-----	71
I-3-4-2-2 Anticorps monoclonaux : -----	71
I-3-4-2-3 Ciblage médié par les systèmes ligands/récepteurs : -----	72
I-3-4-2-4 Lectines : -----	75

<b>II OBJECTIFS DU TRAVAIL</b> .....	<b>76</b>
<b>III RESULTATS EXPERIMENTAUX ET DISCUSSIONS:</b> .....	<b>79</b>
<b>III-1 Effets immunomodulateurs et toxiques des lectines végétales du mûrier noir:</b> .....	<b>81</b>
III-1-1 Morniga M .....	82
III-1-1-1 Introduction de l'article 1: .....	82
III-1-1-2 Article 1 : Two structurally identical mannose-specific jacalin-related lectins display different effects on human T lymphocyte activation and cell death .....	83
III-1-1-3 Discussion de l'article 1: .....	97
III-1-2 Morniga G : .....	100
III-1-2-1 Introduction de l'article 2 : .....	100
III-1-2-2 Article 2 : Morniga G might induce a TRAIL-R dependent apoptosis : .....	100
III-1-2-2-1 Effets immunomodulateurs de Morniga G : .....	100
III-1-2-2-2 Cytotoxicité induite par Morniga G sur les lymphocytes T: .....	101
III-1-2-2-3 Mécanismes cytotoxiques induits par Morniga G sur les cellules Jurkat : .....	102
III-1-2-2-4 Implication des récepteurs de mort et de la O-glycosylation : .....	105
III-1-2-2-5 Modélisation des interactions potentielles entre Morniga G et DR5 : .....	108
III-1-2-3 Discussion de l'article 2 : .....	110
III-1-3 Discussion générale des articles 1 et 2 : .....	114
<b>III-2 Utilisation des lectines végétales comme vecteur de molécules anticancéreuses</b> .....	<b>117</b>
III-2-1 Ciblage de porphyrine pour le traitement PCT .....	117
III-2-1-1 Introduction des articles 3 et 4 : .....	117
III-2-1-2 Article 3 : Morniga G : a plant lectin as an endocytic ligand for photosensitizer molecule targeting towards tumor-associated T/Tn antigens .....	119
III-2-1-3 Article 4 : Targeting of T/Tn antigens with a plant lectin to kill human leukemia cells by photochemotherapy .....	129
III-2-1-4 Discussion des articles 3 et 4 : .....	147
III-2-1-4 -1 Spécificité de reconnaissance et endocytose de MorG (Article 3) : .....	147
III-2-1-4 -2 Evaluation de l'efficacité toxique du conjugué TrMPyP-MorG en PCT (Article 3) : .....	147
III-2-1-4-3 Evaluation de l'efficacité du ciblage de PS par MorG (Article 4): .....	148
III-2-1-4-4 Discussion : .....	148
III-2-2 Evaluation du ciblage de PS adaptés au traitement de tumeurs solides .....	150
III-2-2-1 Introduction de l'article 5 : .....	150
III-2-2-2 Article 5 : Comparative Study of the Phototoxicity of Long-Wavelength Photosensitizers Targeted by the MornigaG Lectin .....	153
III-2-2-3 Discussion de l'article 5 : .....	168
III-2-3: Discussion générale des articles 3, 4 et 5 : .....	170
<b>IV DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES :</b> .....	<b>175</b>
<b>V MATERIEL ET METHODES:</b> .....	<b>183</b>
<b>V-1 Lectines :</b> .....	<b>185</b>
<b>V-2 Cultures et lignées cellulaires leucémiques humaines :</b> .....	<b>185</b>
V-2-1 Lignées leucémiques : .....	185
V-2-2 Lymphocytes T humains du sang périphérique : .....	186
<b>V-3 Couplage covalent de PS à MorG</b> .....	<b>186</b>
V-3-1 Chimie du couplage et purification : .....	186
V-3-2 Caractérisation structurale des conjugués : .....	186
V-3-3 Tests d'héماغglutination .....	187
<b>V-4 Interaction et endocytose des lectines et des conjugués</b> .....	<b>188</b>
<b>V-5 Activité immunostimulante des lectines</b> .....	<b>188</b>
V-5-1 Test de prolifération lymphocytaire : .....	188
V-5-2 Test d'activation lymphocytaire : .....	189
<b>V-6 Activité toxique des lectines et des conjugués TrMPyP-MorG :</b> .....	<b>189</b>
V-6-1 Techniques : .....	189

Test d'exclusion au bleu Trypan :-----	189
Test MTT :-----	190
Test AnnexineV-FITC / Iodure de Propidium :-----	190
Analyse morphologique :-----	190
V-6-2 Toxicité des lectines :-----	191
V-6-3 Activité phototoxique des conjugués PS-MorG-----	191
<b>V-7 Mécanismes intracellulaires induits par les lectines et par les conjugués PS-MorG -----</b>	<b>192</b>
V-8-1 Western blot (Caspases)-----	192
V-8-2 Dosage du céramide -----	193
V-8-3 Dosage des ROS -----	193
<b>V-9 Tests statistiques :-----</b>	<b>194</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE :-----</b>	<b>195</b>



# **I- REVUE GENERALE**





## Introduction :

Les cellules vivantes ont la capacité de se diviser. A chaque division, le système de réplication de l'ADN peut entraîner des modifications au niveau de la séquence nucléotidique. Ces défauts génétiques sont généralement repérés par un système de surveillance du génome et sont corrigés. Lorsque les défauts génétiques ne sont pas corrigés, ces cellules peuvent être reconnues par le système immunitaire comme étant étrangères et détruites. Cependant, dans certaines conditions, les cellules devenues anarchiques échappent aux systèmes de surveillance de l'organisme, ce qui leur permet de proliférer et donner lieu à des tumeurs.

Les altérations génomiques se résument à des modifications des séquences nucléotidiques (addition, substitution, délétion) qui se répercutent sur le phénotype des cellules. Ces modifications peuvent avoir lieu sur des gènes suppresseurs de tumeur, comme par exemple p53, BRCA-1 et -2 ou des oncogènes, tels que c-myc, H-Ras, Her2. La dérégulation de ces gènes modifie les processus cellulaires et permet aux cellules d'acquérir de nouvelles fonctions (division plus rapide, résistance à la mort cellulaire programmée, invasion dans l'organisme). Les modifications génétiques peuvent également se répercuter sur la glycosylation des constituants cellulaires, c'est-à-dire les lipides et les protéines. Les glycanes associés aux protéines assurent le maintien de la structure tridimensionnelle des protéines et participent à la stabilisation des interactions entre différentes protéines. Ainsi, les défauts de la glycosylation peuvent se répercuter sur la fonction des protéines et participer aux processus de cancérisation. Des études ont montré que certaines séquences glycaniques sont préférentiellement exprimées par les cellules cancéreuses. On parle alors d'antigènes glycaniques associés aux tumeurs (ou TACAs pour Tumor Associated Carbohydrate Antigen) [1]. Ainsi, ce type de glycanes, comme par exemple les antigènes T, Tn et sialyl-Tn, peut être utilisé pour le diagnostic et/ou le ciblage des cellules tumorales. Le ciblage des médicaments anticancéreux permet de réduire leur toxicité vis-à-vis des cellules saines, et d'augmenter leur efficacité vis-à-vis des cellules cancéreuses [2].

Les lectines végétales sont des protéines dont la fonction primaire est la reconnaissance glycanique. Le règne végétal possède de nombreuses lectines dont les spécificités divergent. Ces protéines participeraient notamment à la reconnaissance de phytopathogènes par l'intermédiaire des glycanes qu'ils expriment à leur surface. Des études ont montré que certaines lectines, présentant des spécificités glycaniques envers les TACAs, pourraient être utilisées pour le traitement ciblé de certains cancers. Certaines d'entre elles

pourraient être utilisées seules, et d'autres associées de manière covalente à des molécules anticancéreuses, afin de détruire spécifiquement les cellules tumorales.

Le traitement des cancers peut être réalisé par différentes techniques. Les plus conventionnelles sont la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie. La photochimiothérapie (ou PCT) est une technique plus récente et très prometteuse. Son atout principal est le peu d'effets secondaires qu'elle génère. En effet, le principe d'action est celui d'une molécule photosensible (photosensibilisant ou PS) qui devient cytotoxique uniquement en présence de lumière et d'oxygène. En revanche, comme pour les techniques conventionnelles, cette technique présente deux limites majeures : le manque de sélectivité et de biodisponibilité des PS vis-à-vis des cellules cancéreuses.

Ainsi l'objectif de ce travail concerne l'étude de lectines végétales comme molécules vectrices de photosensibilisants. Cette revue générale est articulée en trois grands chapitres. Le premier porte sur la glycosylation associée au cancer. Le second présente l'intérêt des lectines végétales en médecine. Et enfin, la dernière partie introduit la photochimiothérapie anticancéreuse.

## **I-1 La glycosylation :**

La famille des glycoconjugués comprend les glycoprotéines et les glycolipides. Cette famille de molécules est fortement représentée dans tout le vivant (tissus animaux et végétaux, micro-organismes et virus). Cette revue portera essentiellement sur la glycosylation des protéines dont plus de la moitié seraient glycosylées [3]. Chez les eucaryotes, la glycosylation est certainement la modification post-traductionnelle la plus représentée mais également la plus complexe [4]. Les glycoprotéines résultent de la liaison covalente d'un groupement glucidique de masse moléculaire variable appelé glycane à une protéine. La glycosylation est un processus biologique très important qui participe dans la plupart des interactions ligand/récepteur. Par exemple, de nombreuses hormones, cytokines et récepteurs membranaires, les antigènes spécifiques des groupes sanguins A, B et O, et les anticorps sont glycosylés. La qualité de la glycosylation régule ainsi l'activité des systèmes d'interaction ligand/récepteur, comme par exemple les interactions antigéniques avec le BcR ou le TcR, ou les systèmes d'induction de mort cellulaire comme Fas/FasL [5] et TRAIL/TRAIL-R [6].

### ***I-1-1 Structure et biosynthèse :***

La glycosylation a lieu dans le réticulum endoplasmique (RE) et dans l'appareil de Golgi [3,7]. Sa qualité dépend :

- de la structure de la protéine acceptatrice. En raison des encombrements stériques, tous les sites potentiels de glycosylation ne sont pas substitués avec la même efficacité.
- de l'équipement enzymatique de la cellule hôte. La glycosylation n'est pas synthétisée selon un modèle, mais résulte de l'action d'un grand nombre d'enzymes.
- de la structure non linéaire des oligosaccharides qui autorise une immense diversité de motifs puisque plusieurs liaisons entre deux monosaccharides sont possibles.

La glycosylation empreinte deux voies majeures : la *O*-glycosylation et la *N*-glycosylation. Ces deux types de glycosylation se différencient par l'atome permettant la liaison du glycane à la chaîne polypeptidique et, de ce fait, dépendent de la nature de l'acide aminé impliqué.

Les monosaccharides utilisés pour la synthèse des glycanes proviennent principalement de l'alimentation et des voies de recyclage. Le Glucose et le Fructose sont, chez l'homme, les sources majeures de carbone à partir desquelles dérivent la totalité des autres monosaccharides. Des phénomènes de phosphorylation, d'épimérisation et d'acétylation sont à l'origine de la synthèse de tous les glycanes. La glycosylation des protéines peut être divisée en trois étapes [7] :

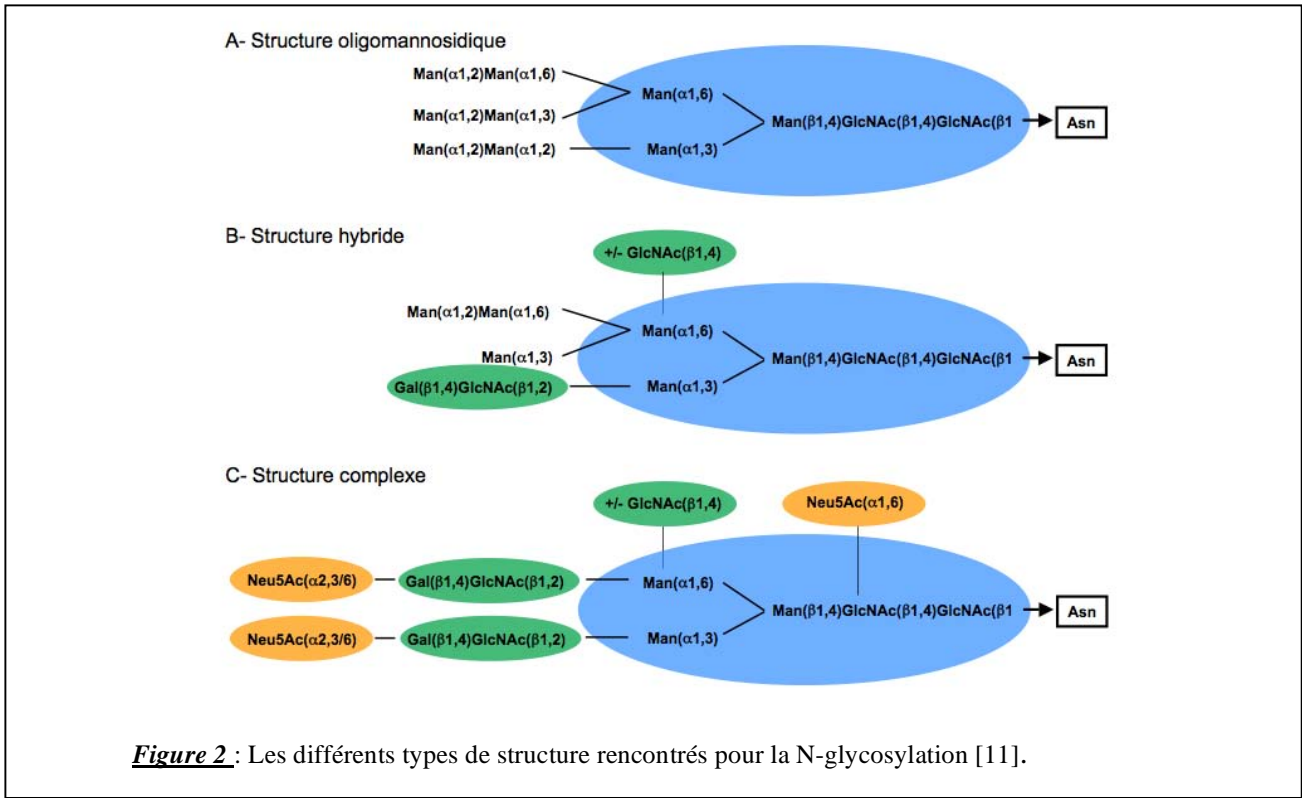
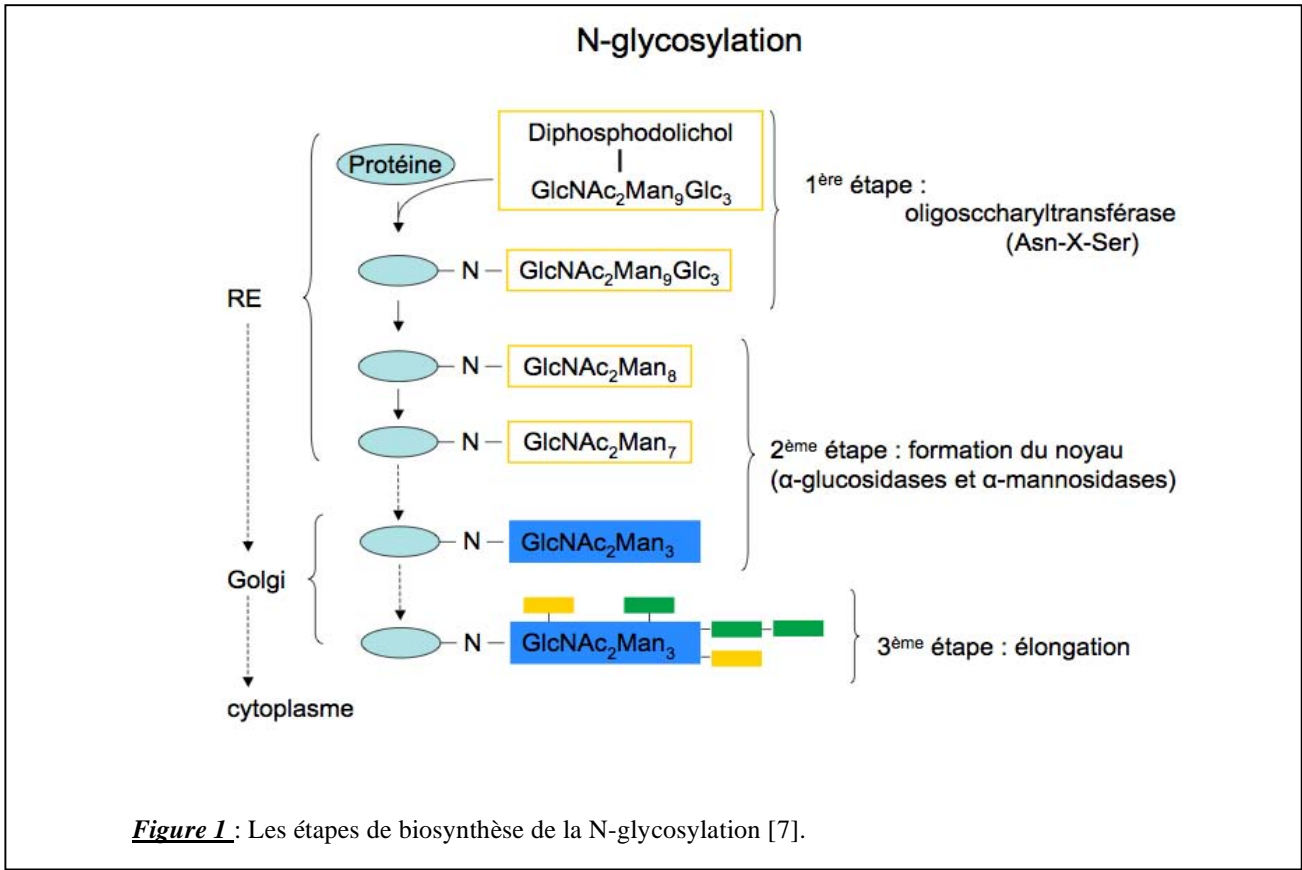
- la première étape est consacrée à la synthèse des glycanes sous forme activée c'est-à-dire liés à un nucléotide diphosphate. Cette activation a lieu dans le cytoplasme.

- la seconde étape consiste au transport de ces glycanes activés vers la lumière du RE ou de l'appareil de Golgi. Cette translocation est réalisée par deux systèmes différents. Le premier mécanisme, dédié uniquement à la *N*-glycosylation, correspond à l'entrée de mannose (Man) ou de glucose (Glc) via le dolichol phosphate (Dol-P) localisé au niveau du feuillet externe de la membrane du RE. Les Dol-P-Man et Dol-P-Glc synthases catalysent le transfert de GDP-Man et de UDP-Glc sur le lipide. Ensuite, l'intervention d'une flippase permet le passage du Dol-P-saccharide du feuillet externe vers le feuillet interne du RE. Le second mécanisme permet l'entrée de monosaccharides qui serviront aussi bien à l'élongation des *O*-glycanes que des *N*-glycanes. Ce transport est réalisé par l'intermédiaire de transporteurs protéiques (NST ou Nucleotide sugar transporter). Ce mécanisme correspond à un antiport, où l'entrée de monosaccharides activés est corrélée de façon équimolaire à la sortie de nucléotides mono-phosphatés [8].

- la dernière étape correspond à la liaison des glycanes à la protéine acceptatrice par l'intermédiaire des glycosyltransférases. Chez les eucaryotes, ces enzymes sont des protéines de type II, présentant un court domaine amino-terminal cytoplasmique, un segment transmembranaire et un domaine carboxy-terminal globulaire localisé dans la lumière du RE ou de l'appareil de Golgi. L'activité catalytique est assurée par le domaine C-terminal. Elles possèdent une spécificité fine pour des substrats sucrés donnés et agissent de manière séquentielle. De plus, elles ont une localisation très précise dans le RE ou l'appareil de Golgi grâce à des signaux de rétention. Enfin, si certaines glycosyltransférases sont exprimées de façon ubiquitaire, d'autres sont modulées spatio-temporellement et permettent de synthétiser des glycanes spécifiques d'un état physiologique cellulaire donné [9]. Toutes ces caractéristiques permettent de réguler la glycosylation et de l'adapter aux conditions physiologiques et aux fonctions de la cellule hôte, comme par exemple la reconnaissance, l'adhésion, la différenciation et l'activation cellulaires.

### **I-1-1-1 La *N*-glycosylation :**

La *N*-glycosylation est la glycosylation la plus documentée. Elle correspond à une chaîne oligosaccharidique liée par une liaison *N*-glycosylaminique à l'hydroxyle porté par la chaîne latérale de l'asparagine contenue dans la séquence consensus Asn-X-Ser/Thr. Les premières étapes de la *N*-glycosylation débutent dans le cytoplasme au niveau de la membrane du RE et sont co-translationnelles. Il s'agit dans un premier temps de la synthèse d'un oligosaccharide de structure  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ , commun à tous les eucaryotes, dont chaque monosaccharide est assemblé de manière séquentielle sur une molécule de dolichol-phosphate ancré à la membrane du RE. Le premier GlcNAc est lié via une liaison pyrophosphate au dolichol. Une fois les 14 monosaccharides assemblés, le dolichol-phospho- $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_9\text{Glc}_3$  pénètre dans la lumière du RE par l'intermédiaire d'une flippase. Dans un deuxième temps, l'oligosaccharide est transféré « en bloc » sur la protéine (*Fig. 1*). Ce transfert est catalysé par l'oligosaccharyltransférase. L'oligosaccharide subit par la suite des étapes d'élagage des résidus Glc et Man, associées à un contrôle qualité du repliement de la protéine [10]. Les protéines dont la mise en conformation a échoué sont adressées au protéasome pour être dégradées. Les protéines dont la conformation est validée sont dirigées vers l'appareil de Golgi qui est le siège de l'élongation du noyau *N*-glycanique, formé d'un pentasaccharide  $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3$ . Différentes glycosyltransférases participent ensuite à l'élongation [11]. Ainsi, selon les enzymes impliquées, la glycosylation aboutira au type oligomannosidique, hybride ou complexe (*Fig. 2*). Ces trois structures diffèrent par leurs extrémités non-réductrices. Les glycanes de type oligomannosidique portent sur ce noyau uniquement des chaînes de mannose, alors que les *N*-glycanes complexes présentent des antennes plus ou moins longues constituées d'une ou plusieurs unités *N*-acétyllactosaminiques ( $\text{Gal}\beta 1,4\text{GlcNAc}$ ) sur lesquelles des structures périphériques s'ajoutent (acide sialique, fucose ou galactose liés en  $\alpha$ ). Les glycanes sont dits de type hybride quand l'une des branches est oligomannosidique et l'autre de type complexe. Ces résidus terminaux (antennes et structures périphériques) sont ajoutés de manière séquentielle par des polypeptide-glycosyltransférases spécifiques de nucléotides-sucres donneurs. Ces enzymes sont le produit de l'expression de 150 à 200 gènes chez l'homme.



### I-1-1-2 La O-glycosylation :

Les étapes de la O-glycosylation ont toutes lieu dans l'appareil de Golgi et ne débutent qu'après le repliement des protéines. Chaque monosaccharide activé est ajouté de manière séquentielle, par des glycosyltransférases spécifiques, au niveau de régions VNTR (Variable Number Tandem Repeat) riches en sérine (Ser) ou thréonine (Thr). Ce type de glycosylation est très complexe puisqu'il comprend chez l'homme 7 familles selon la nature du glycane O-lié (*Tab. 1*). Cette complexité est également retrouvée au niveau de l'élongation de l'oligosaccharide qui aura une qualité variable selon le type cellulaire et l'état physiologique des cellules [4]. Trois parties peuvent être distinguées dans la structure de ces glycanes : une structure de base ou « noyau » (ou core), une structure d'élongation constituée d'éléments répétitifs formant l'ossature du glycane qui peut être linéaire ou ramifiée et, enfin, des structures terminales ou périphériques comprenant une plus grande variété de sucres ainsi qu'éventuellement des résidus sulfate [7]. La combinaison de ces trois éléments aboutit à une quasi-infinité de structures possibles (*Fig. 3*).

Les formes O-glycaniques de type mucine sont les plus représentées chez tous les vertébrés [3,12]. Les mucines sont des protéines de haut poids moléculaire constituées de 50 à 80 % de glycanes. Ces protéines sécrétées ou membranaires participent à la transduction du signal et à la protection des cellules contre les agressions de l'environnement extracellulaire. Huit squelettes O-glycosidiques de type mucine, notés « noyau » 1 à 8 ont été décrits selon la nature et le type de liaison que fait le second monosaccharide avec la N-acétyl-galactosamine (*Tab. 2*). Ce type de glycosylation débute toujours par le transfert d'un résidu GalNAc d'anométrie  $\alpha$  ( $\alpha$ GalNAc) à partir de l'UDP- $\alpha$ GalNAc sur un résidu Ser ou Thr. Ce transfert est catalysé par une UDP-polypeptide-N-acétyl-galactosaminyltransférase (pp $\alpha$ GalNAcT). Chez l'homme, 21 pp $\alpha$ GalNAcT dont les séquences ont un haut degré d'identité sont codées par différents gènes. La structure GalNAc $\alpha$ -O-Ser/Thr est un carrefour commun aux divers squelettes de type mucine qui en dérivent par addition d'un ou plusieurs monosaccharides (*Fig. 4*) [13]. Cette structure de base, masquée ou cryptique dans les cas non-pathologiques, est également appelée **Antigène Tn**. Le core-1, ou **antigène T** (Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ -O-Ser/Thr), est obtenu grâce à la core-1  $\beta$ 1-3-galactosyltransférase 1 (C1GalT-1) ou T synthase qui transfère un résidu galactose sur l'antigène Tn. Le core-2, qui correspond au core-1 avec un résidu GlcNAc lié sur la  $\alpha$ GalNAc, est exprimé par de nombreux types cellulaires (*Tab. 2*). Sa synthèse est réalisée grâce à la core-2  $\beta$ 1-6-N-acétylglucosaminyltransférase (ou C2GnT). La synthèse du core-3 est plutôt restreinte aux cellules épithéliales du tube digestif,

de l'œsophage et des glandes salivaires. L'enzyme responsable de la synthèse de cette structure de base est la core-3  $\beta$ 1-3-N-acétylglucosaminetransférase (ou C3GnT). Les « noyaux » 1 et 2 étant les plus répandus [12].

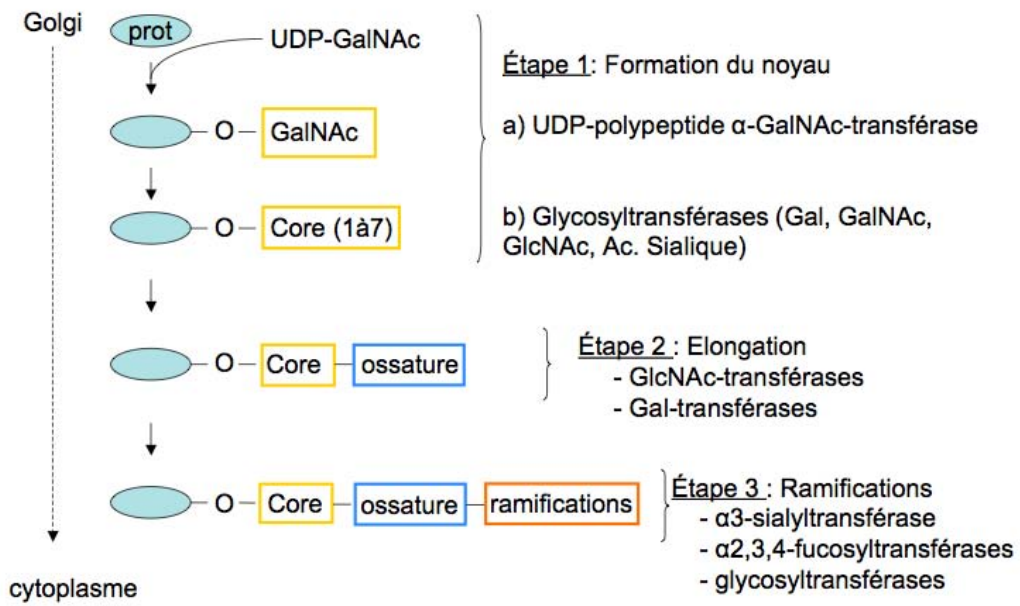
Ensuite, surviennent des réactions d'élongation du noyau glycanique par diverses glycosyltransférases. Ces enzymes diffèrent par la nature du glycanes qu'elles transfèrent, par la nature du substrat protéique sur lequel le résidu glycanique est transféré et par leur localisation subcellulaire. Ce sont des protéines membranaires de type 2 dont la plupart possèdent un domaine lectine à l'extrémité carboxyterminale, spatialement séparé du domaine catalytique. Le domaine lectine permet la liaison de la glycosyltransférase au glycanes déjà en place sur la protéine accepteuse. Les domaines catalytiques, quant à eux, permettent l'addition de nouveaux glycanes. La structure répétitive de la glycosylation de type mucine la plus représentée est le motif glycanique  $\text{GlcNAc}\beta$ 1-3 $\text{Gal}\beta$ 1-4. Ce disaccharide est appelée poly-N-acétyllactosamine. Ces chaînes, qui forment l'ossature des glycanes, sont le support de réactions mettant en place les structures terminales telles que la sialylation et la fucosylation.

<u>Types de O-glycanes</u>	<u>Structure</u>	<u>Glycoprotéines</u>
Mucine	(R)- $\text{GalNAc}\alpha$ 1-Ser/Thr	Membranaires et sécrétées
GAG	(R)- $\text{GlcA}\beta$ 1-3 $\text{Gal}\beta$ 1-3 $\text{Gal}\beta$ 1-4 $\text{Xyl}\beta$ 1-Ser	Protéoglycanes
O-GlcNAc	$\text{GlcNAc}\beta$ 1-Ser/Thr	Cytoplasmiques et nucléaires
O-Gal	$\text{Glc}\alpha$ 1-2 $\pm$ $\text{Gal}\beta$ 1-O-Lys	Collagènes
O-Man	$\text{NeuAc}\alpha$ 2-3 $\text{Gal}\beta$ 1-4 $\text{GlcNAc}\beta$ 1-2 $\text{Man}\alpha$ 1-Ser/Thr	Dystroglycane
O-Glc	$\text{Xyl}\alpha$ 1-3 $\text{Xyl}\alpha$ 1-3 $\pm$ $\text{Glc}\beta$ 1-Ser	Domaine EGF
O-Fuc	$\text{NeuAc}\alpha$ 2-6 $\text{Gal}\beta$ 1-4 $\text{GlcNAc}\beta$ 1-3 $\pm$ $\text{Fuc}\alpha$ 1-Ser/Thr	Domaine EGF

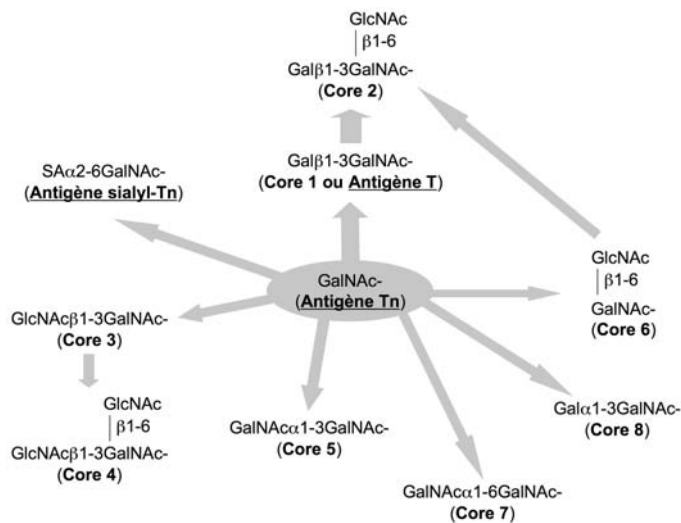
**Tableau 1 :** Les différents types de noyaux O-glycaniques retrouvés chez l'homme [12].



## O-glycosylation



**Figure 3 :** Les étapes de biosynthèse de la O-glycosylation de type mucine [7].



**Figure 4 :** Les différents noyaux de type mucine [12].

<u>Core</u>	<u>Structure</u>	<u>Tissu humain</u>
1	Gal $\beta$ 1-3GalNAc-	La plupart des cellules et protéines sécrétées
2	Gal $\beta$ 1-3(GlcNAc $\beta$ 1-6)GalNAc-	Cellules sanguines
3	GlcNAc $\beta$ 1-3GalNAc-	Salive et colon
4	GlcNAc $\beta$ 1-3(GlcNAc $\beta$ 1-6)GalNAc-	Cellules sécrétant des mucines
5	GalNAc $\alpha$ 1-3GalNAc-	Méconium
6	GlcNAc $\beta$ 1-6GalNAc-	Ovaires
7	GalNAc $\alpha$ 1-6GalNAc-	
8	Gal $\alpha$ 1-3GalNAc-	Bronches

**Tableau 2 :** Les différents noyaux de type mucine et leur localisation tissulaire [12].

### **I-1-1-3 Contrôle de la O-glycosylation :**

La structure de la glycosylation dépend de la spécificité des glycosyltransférases, de leur niveau d'expression, de leur activité et de leur localisation au sein de l'appareil de Golgi [13]. Par exemple, lorsque le core-1 est sialylé (antigène sialyl-T), le core-2 ne peut pas être synthétisé puisque la C2GnT est spécifique du core-1 non substitué. De plus, la C2GnT-1 est en compétition avec les sialyltransférases. Donc l'activité de chacune d'entre elles déterminera la séquence glycanique. Ces activités sont modulées par la présence de composés membranaires, d'ions métalliques et de protéines chaperonnes. Un exemple est donné par la C1GalT (ou T-synthase) qui nécessite la coexpression de la chaperonne Cosmc (ou Core-1  $\beta$ 3-Gal-T specific molecular chaperon). Enfin, un autre facteur important impliqué dans la nature des O-glycanes est le taux des différents substrats (nucléotides sucres ou glycoprotéines accepteuses) [14].

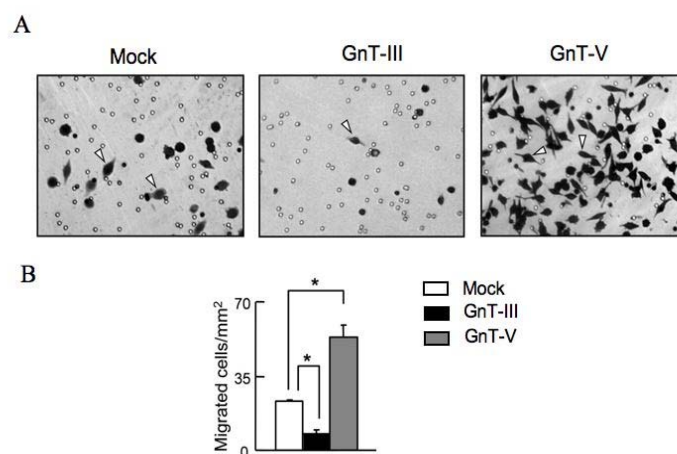
### **I-1-2 Glycosylation et fonctions associées :**

La fonction la plus évidente des glycanes est d'assurer le maintien des structures tridimensionnelle et quaternaire des protéines par l'intermédiaire des liaisons non-covalentes qu'ils réalisent, c'est-à-dire des liaisons hydrogènes, électrostatiques et hydrophobes. En masquant les sites spécifiques de coupures de protéases, les glycanes peuvent également permettre la protection contre une éventuelle protéolyse.

Cependant, la glycosylation est un processus nécessaire aux communications intra- et inter-cellulaires puisqu'elle régit les interactions ligand/récepteur. Sa qualité et sa quantité sont finement régulées selon l'état physiologique des cellules [9]. Ainsi, elle participe au développement des organismes vivants, à l'embryogénèse et à l'immunité, en contrôlant les processus biologiques clefs tels que l'adhésion et la reconnaissance cellulaires, le trafic et la localisation des protéines, l'activation cellulaire et l'endocytose [4]. Par exemple, l'inactivation de l' $\alpha$ -mannosidase II engendre un phénotype infertile chez la souris mâle qui semble être ndû à l'absence d'un *N*-glycane très important pour l'adhésion des spermatozoïdes avec les cellules de Sertoli [15].

### **I-1-2-1 Adhésion et reconnaissance :**

Les molécules d'adhésion les plus représentatives sont les intégrines et les cadhérines. Ces protéines transmembranaires participent à l'adhésion entre cellules, et, entre les cellules et la matrice extracellulaire. La force de l'interaction est fortement modulée par la qualité de la *N*-glycosylation de ces protéines [16]. Une étude *in vitro* a montré que le traitement de l'isoforme  $\alpha_5\beta_1$  par la *N*-glycosidase F, qui clive les *N*-glycanes au niveau de la liaison qu'ils réalisent avec l'Asn, bloque l'interaction de cette intégrine avec la fibronectine. De plus, deux glycosyltransférases, dont les effets sont inverses, entrent en compétition dans le processus de migration cellulaire : il s'agit des *N*-acétylglucosaminyl transférase-III et -V (ou GnT-III et GnT-V) [16]. La GnT-III est responsable de l'addition d'un GlcNAc qui empêche l'élongation de la *N*-glycosylation. La surexpression de cette enzyme dans des cellules de mélanome murin B16 diminue les capacités métastatiques de ces cellules en augmentant l'adhésion entre cellules et en inhibant l'adhésion entre les cellules et la matrice extracellulaire. La surexpression de la GnT-V, enzyme qui catalyse l'addition de branchements  $\beta$ 1-6GlcNAc, induit une augmentation du potentiel métastatique des cellules de cancer gastrique MKN45, alors que la surexpression de la GnT-III dans les mêmes cellules entraîne l'effet inverse [17] (*Fig. 5*). Ces résultats démontrent qu'une régulation fine de la *N*-glycosylation est nécessaire pour assurer les fonctions biologiques des molécules d'adhésion [16,18,19].



**Figure 5 :** Effet de la surexpression des GnT-III et GnT-V sur le potentiel migratoire des cellules tumorales gastriques MKN45. A, Les flèches indiquent des cellules ayant migré. B, Quantification du potentiel migratoire des différents clones de cellules MKN45 [17].

La glycosylation intervient également au niveau des molécules d'adhésion de type sélectines, et, de ce fait, joue un rôle dans les fonctions immunes [20]. Les L-sélectines sont exprimées par les leucocytes, les E-sélectines par les cellules endothéliales et les P-sélectines par les deux types cellulaires. Ce système d'adhésion est finement régulé spatio-temporellement et contribue à l'homéostasie lymphocytaire, à l'hématopoïèse et à l'inflammation. L'importance de la glycosylation lors du recrutement et de l'activation des cellules immunes pendant une réponse inflammatoire a été étudiée. Il a été montré que la migration des cellules immunes et leur adhésion au niveau des cellules endothéliales mettent en jeu des reconnaissances glycaniques [21,22]. Le roulement des leucocytes au niveau des cellules endothéliales se fait par l'intermédiaire des L-sélectines. Les sélectines reconnaissent des structures de type sialyl-Lewis<sup>x</sup> portées par les core-1 et -2. Il a été montré que des souris déficientes en C2GnT-3 sont victimes de perturbations du système immunitaire, comme par exemple une neutropénie et une hypo-immunoglobulinémie, conduisant à une susceptibilité à déclencher des colites [23].

Enfin, les glycanes peuvent participer à la mise en place et à l'échappement de certains virus. Par exemple, différentes observations ont montré que le nombre de *N*-glycanes de la protéine d'enveloppe du HIV-1 est en rapport avec le niveau d'antigénicité du virus [24,25].

### **I-1-2-2 Trafic et localisation des protéines :**

Il est connu que les protéines à transporter vers le noyau portent une étiquette NLS (pour Nuclear Localization Signal), séquence peptidique reconnue par les importines [26]. En plus du signal de transport assuré par une séquence peptidique, d'autres mécanismes faisant intervenir des séquences signal glycaniques ont été mis en évidence [27]. Il a été observé dans le noyau et le cytoplasme, la présence de ligands protéiques *O*-N-acétylglucosaminylés et de transporteurs protéiques de type lectines, spécifiques du motif *O*-GlcNAc, tels que la famille des Hsp70 (Heat Shock Protein) [28,29]. De plus, il a été montré un lien direct entre la qualité de la *O*-glycosylation et la localisation cellulaire d'un ligand des intégrines, le Tiggrin, chez la Drosophile. L'inhibition de l'activité enzymatique de la glycosyltransférase *pgant3* (*ppα*GalNAc Transférase 3) modifie la qualité de la *O*-glycosylation du ligand, diminuant la capacité d'adhésion des cellules [30].

De plus, la famille des pannexines, constituée des glycoprotéines Panx-1, -2 et -3, participe au relargage d'ATP par les cellules épithéliales du tractus respiratoire lorsqu'elles sont exprimées à la membrane apicale [31]. Les dernières observations moléculaires de cette famille montrent que leur glycosylation est non seulement nécessaire à leur localisation membranaire mais également à leur oligomérisation, c'est-à-dire à la formation de canaux membranaires impliqués dans le relargage d'ATP [32].

### **I-1-2-3 Activation et mort cellulaire :**

La glycosylation est une structure très importante dans tous les processus immunitaires. La qualité de la glycosylation contrôle l'activité des systèmes ligand/récepteur, et de ce fait, module l'état physiologique des cellules immunes. L'homéostasie des cellules immunes, et en particulier des lymphocytes, est régulée par la balance mort/activation cellulaire. De nombreuses études ont montré que ces processus seraient régis par la qualité de la glycosylation exprimée à la surface de ces cellules, c'est-à-dire par l'activité de glycosyltransférases spécifiques.

Concernant la mort cellulaire, la Galectine-1, une protéine à activité lectine spécifique du motif N-acétyl-lactosamine, est surexprimée par les lymphocytes T régulateurs et participe à l'homéostasie lymphocytaire [33]. Il a été montré que les lymphocytes T sont plus ou moins sensibles à la mort cellulaire induite par la Galectine-1 selon la qualité de la glycosylation des

glycoprotéines membranaires, telles que le CD45. La sialylation à l'extrémité des chaînes glycaniques masquerait les épitopes reconnus par la Galectine-1 [34].

De plus, il a été montré que l'inhibition pharmacologique de la *O*-glycosylation du récepteur DR5 par l'inactivation de la N-acétyl-galactosaminyl-transférase 14 entraîne une perte de la sensibilité à l'apoptose induite par le ligand TRAIL, alors que la surexpression de cette enzyme rend les cellules sensibles [6]. Ces observations ont été attribuées à l'impossibilité des complexes TRAIL/DR5 de former des clusters, le clustering de ces complexes étant nécessaire à la signalisation apoptotique induite par TRAIL. De même, il a été montré que des cellules de cancer du poumon sensibles à la Dulanermine et au drozitumab, respectivement un agoniste du DR5 et un anticorps anti-DR5, présentent un niveau d'expression de la GalNAc-Transférase 14 plus élevé que le même type de cellules résistantes à ces deux agents [35].

D'autre part, de nombreuses études montrent l'implication de la *N*-glycosylation dans les phénomènes d'activation lymphocytaire. Par exemple, la déficience en GlcNAcT-V, enzyme responsable de l'addition de branchements b1-6GlcNAc, chez des souris provoque une diminution du potentiel d'activation des lymphocytes T. Ces souris ont une susceptibilité accrue à déclencher des maladies autoimmunes [36]. De même, le CD28, molécule de costimulation exprimée par les lymphocytes T, est composée à 50 % de *N*-glycanes. Il a été montré que l'hypoglycosylation de ce récepteur le rend plus actif [37].

Le fait que les glycanes des cellules tumorales connaissent de profondes modifications peut en partie expliquer les perturbations qui se manifestent dans l'adhésion cellulaire (par exemple, la perte de l'inhibition de contact et la diffusion métastatique), la reconnaissance et la perméabilité membranaire (phénomènes de résistance aux drogues). De plus, l'apparition de néo-antigènes de surface est susceptible d'induire ou de diminuer la réaction immunitaire de l'organisme contre les cellules tumorales.

### ***I-1-3 O-Glycosylation et cancer :***

Le développement embryogénique et l'activation cellulaire étant accompagnés de changements caractéristiques de la glycosylation, il n'est pas étonnant que la transformation et la progression tumorales soient également associées à des modifications de la glycosylation comme le raccourcissement ou l'élongation des chaînes glycaniques [1,4,38,39,40].

De nombreux types de séquences glycaniques ont été étudiés dans le but de montrer la disparition ou la surexpression de certaines structures, l'apparition de structures incomplètement glycosylées, l'accumulation de structures précurseurs et, plus rarement, l'apparition de néo-antigènes associés aux cellules tumorales. Une étude récente a comparé la structure glycanique des glycoprotéines sériques de patients atteints de cancer du poumon à celles de patients sains. 107 glycopeptides porteurs de modifications glycaniques ont été identifiés chez les patients atteints de cancer [41]. Ces modifications sont une conséquence du désordre biologique caractéristique des cellules tumorales. En raison de leur micro-évolution génétique et de la sélection des cellules les plus aptes à proliférer et à envahir les tissus environnants, seuls certains types de glycanes sont retrouvés à la surface de ces cellules. Il s'agit des antigènes glycaniques associés aux tumeurs ou TACA (pour Tumor-Associated Carbohydrate Antigen). Ainsi, l'infiltration de métastases dans le cerveau chez des patients atteints de cancer du sein a notamment été corrélée à une augmentation de l'expression de l' $\alpha$ 2,6-sialyltransférase ST6GALNAC5 [42]. De même, il a été montré dans le cancer du sein une augmentation de l'expression de la GALNT6 qui est capable de stabiliser la mucine 1 en la glycosylant. L'inactivation de cette enzyme conduit à une augmentation de l'adhésion cellulaire et donc à une diminution du pouvoir invasif de ces cellules [43]. Ces modifications de la glycosylation sont généralement dues à des défauts métaboliques (activité enzymatique) associés à des perturbations génétiques (mutations génétiques). Par exemple, il a été mis en évidence que l'expression de gènes associés à la glycosylation (tels que ceux qui codent pour des glycoprotéines et/ou des protéines associées à la biosynthèse de la glycosylation) est modifiée dans la transition épithélio-mésenchymateuse de lignées cellulaires humaines cancéreuses [44]. Ces défauts de glycosylation affectent les propriétés physiques et fonctionnelles des glycoprotéines membranaires ou solubles qui peuvent être des molécules d'adhésion et de reconnaissance ou des systèmes ligand/récepteur impliqués dans la signalisation cellulaire. Les cellules tumorales sont donc associées à des modifications qualitatives (modulation de l'activité des glycosyltransférases) mais aussi quantitatives (modulation de l'expression des glycoprotéines) de la glycosylation.

### **I-1-3-1 Expression des antigènes T, Tn et sialyl-Tn:**

Dans la plupart des cas, le développement tumoral est accompagné d'un raccourcissement des chaînes *O*-glycaniques, dû à la perte ou à l'augmentation de l'activité de certaines glycosyltransférases. Par exemple, il a été montré que la GalNAcT-14 est

surexprimée dans 80 % des cancer du sein et que son expression augmente en fonction du stade de développement du cancer [45]. De plus, certains facteurs de transcription impliqués dans la cancérogenèse contrôlent la transcription de glycosyltransférases. Par exemple, le facteur E1AF qui semble être impliqué dans l'invasion tumorale et les métastases induirait l'expression du gène codant pour la  $\beta$ 1-4Galactosyl-Transfêrase I, enzyme nécessaire pour la migration des cellules métastatiques de cancer du sein [46].

Ceci se traduit par l'expression d'antigènes glycaniques normalement masqués tels que **les antigènes Tn** ou CD175 (GalNAc $\alpha$ 1-*O*-Ser/Thr), **sialyl-Tn** ou CD175s et **T** ou CD176 ou antigène de Thomsen-Friedenreich ou core-1 (Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ 1-*O*-Ser/Thr). Ces antigènes coexistent dans la plupart des cancers, et sont retrouvés en particulier dans les cancers épithéliaux, tels que les cancers du colon, du sein, et des poumons [47,48,49] et les leucémies [50]. Certaines protéines membranaires et/ou sécrétées expriment une forte densité de *O*-glycanes, comme par exemple les mucines pour les cellules épithéliales et certaines molécules à la surface des cellules immunitaires, telles que le CD34 et le CD45. De nombreux travaux s'intéressent au ciblage et à la détection de ces antigènes dans le cadre du cancer [48,51,52,53,54].

L'antigène Tn est un antigène carcinoembryonnaire (ou CEA). Il est ajouté par les pp $\alpha$ GalNAcTransférases. La surexpression de ces enzymes pourrait représenter des marqueurs de certains cancers [55]. L'expression de l'antigène Tn est normalement présente durant les stades précoces du développement humain, notamment dans les tissus épithéliaux et mésenchymatux [56]. Sa présence a également été mise en évidence durant le développement embryogénique de la drosophile [57] et de la souris [58]. En physiopathologie, il a été montré que la présence de l'antigène Tn est due à une perte d'activité de la core 1  $\beta$ 1-3galactosyltransfêrase (ou T-synthase), la seule enzyme responsable de la formation du core 1 [59]. La perte d'activité de la T-synthase a été corrélée avec la présence de mutations sur le gène codant pour la protéine chaperone Cosmc (core-1  $\beta$ 1-3GalT specific molecular chaperone) requise pour son bon repliement [54,60,61,62,63]. Comme l'inactivation de la T-synthase, l'inactivation de Cosmc chez des souris provoque une forte expression de l'antigène Tn, accompagnée de perturbations de l'angiogénèse embryonnaire et conduisant à un phénotype hémorragique létal [64,65]. Les animaux hétérozygotes survivants présentent des anomalies proches de celles retrouvées pour des maladies humaines associées à l'expression de l'antigène Tn, comme par exemple le syndrome Tn [66]. Des retards de la croissance, des hémorragies et des perturbations de l'hématopoïèse ont également été mises en évidence.



Chez l'homme, l'antigène Tn représente un marqueur tumoral de mauvais pronostic associé à une progression tumorale accélérée et à des métastases [67]. Cet antigène est présent dans 70 à 90 % des cancers épithéliaux [47,48,68,69]. L'injection d'anticorps anti-antigène Tn couplés à un agent d'imagerie dans un modèle murin de métases permet la détection de la tumeur primaire et des cellules tumorales isolées. Ces anticorps peuvent également inhiber l'adhésion des métastases à l'endothélium lymphatique [51].

L'antigène sialyl-Tn (CD175s) est obtenu après sialylation de l'antigène Tn par des  $\alpha$ 2,6-sialyltransférases [70]. Ces enzymes ont également été mises en évidence dans certains cancers, comme par exemple le cancer du sein [71,72]. La présence de cet antigène a également été corrélée à des mutations du gène *Cosmc* [62]. La surexpression des antigènes Tn et sialyl-Tn a été montrée chez des patients atteints de tumeurs et de métastases ovariennes [73] ou de cancers colorectaux [74,75]. Le CD175s serait aussi un marqueur de mauvais pronostic concernant la durée de survie du patient [76]. Récemment, la protéine MUC2 a été identifiée comme étant le porteur principal du CD175s dans la plupart des cancers gastriques [77]. La surexpression de cet antigène dans des lignées cancéreuses du sein entraîne une augmentation de leur agressivité, c'est-à-dire une diminution de l'adhésion cellulaire et une augmentation du pouvoir invasif [72,78,79].

L'antigène T, quant à lui, pourrait être exprimé en raison d'une augmentation du taux d'ARNm codant pour des transporteurs d'UDP-Gal [80]. Contrairement à l'antigène Tn, la surexpression de l'antigène T chez des souris déficientes en C2GnT ne provoque pas de phénotype léthal ou infertile mais provoque des troubles au niveau de la barrière digestive [23]. Cet antigène serait moins fréquents dans les cancers gastriques que les antigènes Tn et sTn [81].

### **I-1-3-2 Antigènes glycaniques associés aux tumeurs et vaccination antitumorale :**

Les antigènes glycaniques associés aux tumeurs (TACAs), et plus particulièrement les antigènes Tn et sialyl-Tn, sont également étudiés dans le cadre de la vaccination anti-tumorale [68,82,83,84,85,86].

L'antigène Tn peut participer à la reconnaissance des cellules tumorales par le système immunitaire. Par exemple, les cellules dendritiques et les macrophages expriment à leur surface la lectine MGL (Macrophage Galactose-type Lectin) qui a la capacité d'interagir avec les antigènes Tn. Cette reconnaissance permet par la suite d'exprimer des peptides porteurs de

l'antigène Tn (épitopes Tn) par les molécules du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) et d'entraîner une réponse immunitaire anticancéreuse [87,88,89]. La vaccination par l'antigène Tn pour traiter le cancer de la prostate est en phase I et II cliniques. Cependant, contrairement à ce qui avait été démontré, l'antigène Tn ne serait pas forcément le meilleur marqueur tumoral du cancer de la prostate. Il serait donc nécessaire de trouver d'autres structures glycaniques pour la vaccination [90].

La vaccination antitumorale par le CD175s est en étude clinique sur des patients atteints principalement de cancers du sein [91]. Un vaccin est commercialisé par la firme américaine Biomira sous le nom de Theratope® [92]. Il est constitué de la métalloprotéine KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) associée à l'antigène CD175s. Plus récemment, l'injection de Theratope® dans un modèle tumoral murin protège les souris via une production d'anticorps anti-sTn [93]. Il a été mis en évidence, chez des patients atteints de cancer du sein, l'effet vaccinant du CD175s sous forme clusterisée [94].

Malgré un résultat clinique positif sur la vaccination antitumorale par l'antigène T chez des patients atteints de cancer de la prostate [95], et une étude qui montre que cet antigène peut activer *in vivo* des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) spécifiques qui sont capables *in vitro* de reconnaître des cellules exprimant l'antigène T [96], cet antigène apparaît être moins intéressant, car moins exprimé et moins restreint au cancer que les deux autres.

En conclusion, les antigènes T, Tn et sialyl-Tn ont clairement été identifiés comme étant préférentiellement exprimés par les cellules tumorales. L'apparition de ces antigènes est dû à un dysfonctionnement des glycosyltransférases induit par :

- des mutations au niveau du gène correspondant, générant une protéine mutante sans activité, ou au niveau de gènes codant pour des protéines chaperonnes.

- des oncogènes ou des facteurs de transcription impliqués dans l'oncogénèse est la progression tumorale.

Les études concernant les TACAs sont réalisées dans un but diagnostique, pronostique et thérapeutique du cancer. Les CD175 et CD175s apparaissent comme étant très intéressants puisqu'ils sont surexprimés dans les cellules tumorales. Les études thérapeutiques concernant le ciblage de ces antigènes sont réalisées soit pour vectoriser des molécules anticancéreuses soit pour activer les défenses immunes anticancéreuses spécifiques de ces TACAs.

## I-2 Les lectines végétales

### I-2-1 Présentation

#### I-2-1-1 Historique :

L'étude des lectines a été introduite par P.H. Stillmark en 1888. Celui-ci a dans un premier temps mis en évidence l'existence de molécules ayant la capacité d'agglutiner les érythrocytes. Ces molécules ont ainsi été nommées hémagglutinines ou phytoagglutinines [97]. La première de ces molécules a été extraite du ricin (*Ricinus communis*) et a été appelée Ricine. La même activité a ensuite été découverte dans les extraits du pois rouge (*Abrus precatorius*) par P. Ehrlich : cette molécule a été nommée Abrine. Par la suite, il a été constaté qu'en plus de leur capacité hémagglutinante, ces deux molécules avaient une activité toxique. La découverte de ces molécules végétales a permis de faire les premières observations concernant la spécificité du système immunitaire. En effet, après immunisation de souris par des injections sous-cutanées répétées à des doses non léthales de Ricine ou d'Abrine, P. Ehrlich a constaté que le sérum issu de l'immunisation par la ricine protégeait les animaux contre les effets toxiques d'injections de ricine mais pas d'abrine et vice-versa. En 1919, J.B. Summer a purifié la concanavaleine A ou ConA (*Conavalia ensiformis*) et a mis en évidence, en 1936 avec S.F. Howell, que cette phytoagglutinine pouvait également agglutiner d'autres types cellulaires que les érythrocytes (comme par exemple les levures) et précipiter le glycogène en solution. Par la suite, il a été observé que l'hémagglutination induite par la ConA peut être inhibée par une solution de sucrose. Ces études ont permis d'introduire la notion de spécificité de reconnaissance des sucres par les phytoagglutinines. En parallèle, après les avancées de K. Landsteiner concernant les différences d'activité des phytoagglutinines selon les types cellulaires [98], en 1957, O. Mäkelä a réalisé une étude sur des extraits de graines de 743 espèces de légumineuses différentes [99]. Il a mis en évidence qu'un peu plus d'un tiers de ces extraits possèdent une activité hémagglutinante et qu'environ un dixième d'entre eux révèlent une spécificité envers les groupes sanguins A, B ou O. Ces découvertes ont joué un rôle essentiel dans les études structurales des déterminants antigéniques de groupes sanguins.

Le terme de lectine a été proposé par W.C. Boyd et E. Shapleigh à partir du latin *legere* qui se traduit par choisir [100]. En 1960, P.C. Nowell a étudié l'effet de la phytohémagglutinine PHA (*Phaseolus vulgaris*) sur des lymphocytes normaux humains [101]. Alors que les lymphocytes étaient décrits comme étant incapables de se multiplier, il a

montré non seulement que la PHA peut les stimuler mais également qu'elle peut entraîner leur mitose. De plus, l'utilisation de mannose a montré que l'effet mitogénique de la ConA est inhibable et donc que cet effet est dépendant de la reconnaissance des sucres localisés à la surface des lymphocytes [102]. C'est une des premières démonstrations du rôle biologique des glycanes localisés à la surface cellulaire. Les lectines sont alors devenues des outils d'étude des événements biologiques liés à la stimulation lymphocytaire. Par exemple, R.C. Gallo a découvert l'existence d'un facteur de croissance des lymphocytes T, connu maintenant sous le nom d'interleukine-2, dans le milieu conditionné de lymphocytes T humains stimulés par la PHA [103]. Au cours de ces années, J.C. Aub a découvert que la lectine du germe de blé (Wheat germ agglutinin ou WGA) a la capacité d'agglutiner préférentiellement les cellules malignes [104]. Plus tard, les mêmes observations ont été rapportées avec la ConA et la lectine de soja (Soybean agglutinin ou SBA). Ces observations ont permis de mettre en évidence que le développement du cancer est associé à des modifications des glycanes de la surface cellulaire.

Le nombre de lectines isolées a augmenté avec l'introduction des purifications sur chromatographie d'affinité. Ainsi, environ 300 lectines de plantes ont été isolées et caractérisées [105]. L'intérêt de purifier un très grand nombre de lectines est dû à leur utilisation comme outil de détection, d'isolement et de caractérisation des glycoconjugués présents dans les cellules vivantes [106]. Les applications majeures des lectines végétales sont [107]:

- La détection, l'isolement et la caractérisation de glycoconjugués en solution
- L'étude des carbohydrates cellulaires (histo/cytochimie ; typage sanguin)
- La cartographie des voies de signalisations neuronales
- La stimulation mitogénique des lymphocytes
- La sélection clonale de cellules résistantes aux lectines
- L'étude de la biosynthèse des glycoprotéines

Toutes ces applications permettent d'étudier les modifications glycaniques associées aux processus cellulaires physiologiques et pathologiques, de la différenciation cellulaire au cancer.

### **I-2-1-2 Classification :**

En 1980, les études de biochimie structurale ont mis en évidence l'oligomérisation des lectines. Certaines sous-unités sont responsables de la reconnaissance glycanique et d'autres

ont une activité catalytique cytotoxique. Ces avancées scientifiques ont permis de commencer à classer les lectines selon leur structure quaternaire [105]:

- les mérolectines (monovalentes et donc non agglutinantes)
- les hololectines (di ou multivalentes, concernent la plupart des lectines végétales)
- les chimérolectines (protéine de fusion ayant une activité de reconnaissance glycanique et une activité cytotoxique)
- les superlectines (oligomères polyspécifiques constitués de plus de quatre monomères)

Un classement selon la phylogénie et la similarité des structures est également utilisé [105]:

- les « Legume lectins » ou « légumineuses » (ex : Concanavaline A)
- les « chitin-binding proteins » (ex : *Wheat germ* agglutinin ou WGA)
- les « monocot-Mannose binding lectins » (*Galanthus nivalis* agglutinin ou GNA)
- les « Type 2 RIP (Ribosome Inactivating Protein) » (ex : Ricine)
- les « Jacalin Related Lectins » ou JRL (ex : Jacaline)
- les « Amaranthin »
- les « Cucurbitaceae »

Dans chaque famille, les lectines peuvent être sous-classées en fonction de leur spécificité glycanique. Ainsi, certaines lectines seront plutôt utilisées pour étudier la *N*-glycosylation et d'autres la *O*-glycosylation (*Tab. 3*). De plus, l'activité de liaison spécifique à des glycanes a orienté l'étude des lectines vers la médecine. Les études concernent en majorité la caractérisation de leur structure, la détermination de leur spécificité glycanique, et de leur activité biologique vis-à-vis de cellules humaines.

Famille	Lectine	Plante	Spécificité monosaccharidique	Glycosylation potentiellement ciblée	Structure	Masse moléculaire approximative des protomères (KDa)
Lectines de légumineuse	Concanavalin A (ConA)	<i>Canavalia ensiformis</i> (haricot de Jack)	Man/Glc	N-glycosylation	tétramère	30
	Phytohémagglutinin (PHA)	<i>Phaseolus vulgaris</i> (haricot rouge)	GlcNAc(1-2)Man	N-glycosylation	tétramère	30
	Peanut Agglutinin (PNA)	<i>Arachis hypogaea</i> (cacahuète)	Gal	O-glycosylation	tétramère	30
	Soybean Agglutinin (SBA)	<i>Phaseoleae glycininae</i> (Soja)	GalNAc	O-glycosylation	tétramère	30
	Dolichos biflorus Lectin (DBL)	<i>Dolichos biflorus</i> (haricot dolique)	GalNAc	O-glycosylation	tétramère	30
	Vicia villosa Lectin (VVL)	<i>Vicia villosa</i> (haricot)	GalNAc	O-glycosylation	tétramère	25
Lectines liant la chitine	Wheat Germ Agglutinin (WGA)	<i>Triticum vulgare</i> (germe de blé)	GlcNAc	N-glycosylation	dimère	17
Lectines RIP de type II	Ricin	<i>Ricinus communis</i> (Ricin)	GalNAc	O-glycosylation	hétérodimère (x2)	35; 34
	Abrin	<i>Abrus precatorius</i> (Pois rouge)	Gal	O-glycosylation	hétérodimère (x2)	35; 34
	Mistletoe lectin I	<i>Viscum album</i> (Gui)	Gal	O-glycosylation	hétérodimère (x2)	35; 30
	Mistletoe lectin II		Gal/GalNAc			30; 30
	Mistletoe lectin III		GalNAc			25; 30
Lectines apparentées à la Jacaline	Jacalin (Jaca)	<i>Artocarpus integrifolia</i> (Fruit du Jack)	Gal	O-glycosylation	tétramère	15
	Maclura pomifera agglutinin (MPA)	<i>Maclura pomifera</i> (Orange des osages)	Gal	O-glycosylation	tétramère	15
	Artocarpus lakoocha agglutinin (ALA)	<i>Artocarpus lakoocha</i> (Monkey Jack fruit)	Gal	O-glycosylation	hétérodimère (x2)	12; 16
	Artocarpin (Arto)	<i>Artocarpus integrifolia</i> (Fruit du Jack)	Gal/Man/Glc	O-/N-glycosylation	tétramère	15
	Morniga G (MorG)	<i>Morus nigra</i> (Mûrier noir)	GalNAc	O-glycosylation	tétramère	15
	Morniga M (MorM)	<i>Morus nigra</i> (Mûrier noir)	Man	N-glycosylation	tétramère	15

**Tableau 3 :** Principales lectines végétales étudiées pour leurs activités potentielles anticancéreuses.

### I-2-1-3 Les lectines : protéines de reconnaissance glycanique :

Les fonctions cellulaires des lectines sont directement associées à leur capacité à interagir avec les glycanes. En effet, elles sont toutes constituées d'au moins une cavité de reconnaissance glycanique qui possède une plasticité et leur permet d'interagir plus spécifiquement avec certains glycoconjugués que d'autres [108]. Ces glycanes interagissent par des liaisons non-covalentes avec les acides aminés formant la cavité de reconnaissance saccharidique de la lectine. La partie non glycanique des glycoconjugués peut également interagir avec les acides aminés avoisinant la cavité de reconnaissance [109]. De plus, ces protéines, étant en général multivalentes, sont très affines pour les clusters de glycoconjugués. Par exemple, l'interaction de l'agglutinine de soja (SBA), spécifique de la  $\alpha$ GalNAc, a été étudiée avec des mucines présentant une forte densité d'antigènes Tn. Les résultats mettent en avant une affinité très forte de la lectine pour les clusters d'antigène Tn. La lectine interagit avec les glycoprotéines selon un modèle de « bind & jump » qui correspond à l'association/dissociation des sites de reconnaissance glycanique de la lectine d'un antigène Tn à l'autre le long de la chaîne polypeptidique [110].

### I-2-1-4 Fonctions chez les végétaux :

Les lectines sont des protéines ubiquitaires. Chez les végétaux, elles sont retrouvées dans la plupart des tissus, et en particulier dans les graines où elles peuvent représenter une grande proportion des protéines totales. La fonction de ces protéines est orientée vers des

mécanismes de défense contre les phytopathogènes [107,111]. Par exemple, la GNA est reconnue pour ses propriétés insecticides. Son expression dans des plants de tabac ou de riz les rend résistants aux insectes ravageurs [112,113]. Des études ont montré que la concentration en lectine peut augmenter en réponse à une infection par des pathogènes [114] et que certaines d'entre elles sont détectables dans le noyau et le cytoplasme uniquement en réponse à un stress [115].

Plus récemment, il a été montré un rôle régulateur de l'expression génique de certaines lectines, comme par exemple la lectine du tabac Nictaba. L'expression de cette lectine est détectable uniquement en condition de stress et peut interagir dans ce cas avec des glycoprotéines nucléaires, et notamment les histones H2B [116].

En raison de la demande croissante d'outils de diagnostic et de nouveaux médicaments anticancéreux et du fait que la qualité des glycanes exprimés à la surface des cellules tumorales est modifiée, les lectines végétales peuvent avoir un rôle important en cancérologie [117,118]. De plus, des études épidémiologiques ont montré qu'un régime alimentaire à base de plantes est fortement associé à la diminution des risques de développer un cancer [119]. Ceci peut être dû au fait que les plantes contiennent des composés actifs qui peuvent altérer les voies de signalisation associées à l'initiation, la promotion ou la progression tumorales. Une des classes de composés végétaux largement étudiés dans ce domaine est celle des lectines [117].

## ***I-2-2 Lectines végétales et cancer :***

### **I-2-2-1 Effets toxiques et immunomodulateurs :**

Les lectines végétales sont connues depuis longtemps pour avoir des propriétés immunomodulatrices. Par exemple, la ConA, la PHA (Phaseolus vulgaris Agglutinin) et la PWM (Pokeweed Mitogen) sont utilisées en immunologie pour la stimulation des lymphocytes *in vitro* [120]. Depuis, les études concernant les lectines végétales ont montré la capacité de certaines d'entre elles à activer spécifiquement diverses sous-populations lymphocytaires, indépendamment de leur spécificité monosaccharidique. En effet, la ConA et la PHA, dont les spécificités monosaccharidiques sont respectivement dirigées contre le Mannose et la GalNAc, activent les lymphocytes T, alors que la PWM, dont la spécificité glycanique est dirigée contre la GlcNAc, active indifféremment les lymphocytes T et B. De

plus, alors que leur existence a été longtemps ignorée, les lectines animales, comme par exemple la Galectine-1, démontrent des effets immunomodulateurs *in vitro* et *in vivo* [121]. Ces dernières observations relancent l'intérêt d'utiliser des lectines végétales en biomédecine dans le but de mimer, ou de bloquer, les effets des lectines animales endogènes afin de moduler les réponses immunitaires. Ainsi, par exemple, il a été montré que la ConA aurait un effet anticancéreux dans un modèle de cancer hépatique chez la souris. Cette lectine active les lymphocytes T CD8+ et induit la mise en place d'une mémoire immune spécifique [122]. Enfin, la lectine du gui (ou Mistletoe Lectin) qui est actuellement utilisée en clinique comme adjuvant de traitements anticancéreux induit, à faible dose, l'activation des défenses immunes anticancéreuses [123].

Les lectines peuvent avoir un effet toxique direct sur les cellules cancéreuses ou un effet toxique indirect en activant les défenses immunes anticancéreuses. L'exemple le plus parlant est celui de l'extrait de Gui, commercialisé sous le nom d'Iscador®, qui est utilisé en clinique comme adjuvant de radiothérapie et de chimiothérapie [124]. Il a été montré que celui-ci contient un composé toxique dont la structure et la fonction sont apparentées à celles de la lectine Mistletoe Lectin (ML) ou encore appelée Viscumine [125]. A des doses faibles injectées en intrapéritonéal dans un modèle murin de mélanomes, cette lectine exerce un effet cytotoxique et immuno-modulateur. Elle est capable d'induire une diminution de 35% de la masse tumorale et de 55% du nombre de métastases pulmonaires, accompagnée d'une augmentation significative du nombre de cellules dendritiques infiltrant la tumeur primaire [126].

Les lectines sont des protéines ubiquitaires chez les végétaux, et peuvent être présentes en grande quantité notamment dans les graines. Par exemple, elles représentent jusqu'à 5% du poids sec des haricots et 6,5% de celui des graines de soja. Le fait que celles-ci soient retrouvées dans l'alimentation commune (tomates, lentilles, haricots, ...) indique qu'à des doses raisonnables la majorité des lectines ne sont pas toxiques pour l'organisme. Après ingestion, certaines lectines comme la PNA, résistent fortement à la digestion et peuvent être retrouvées intactes et fonctionnelles dans les faeces [127]. Ceci leur donne la capacité de pénétrer dans la circulation sanguine en conservant leur activité biologique, phénomène important pour une utilisation en médecine [128,129]. De plus, en se fixant à la surface des cellules cibles, la plupart des lectines ont la capacité d'être internalisées.

Une famille particulièrement intéressante de glycoconjugués est celle des antigènes glycaniques associés aux tumeurs (TACAs) T, Tn et sTn. Les effets des lectines spécifiques de TACAs sont étudiées *in vitro* et *in vivo* pour des applications diagnostique, pronostique et



thérapeutique dans le cancer (*Tab. 4*). Les trois familles de lectines végétales majoritairement étudiées dans le cadre de leurs activités en biologie humaine sont les lectines de légumineuses, comme Con A, PNA et PHA, les RIP de type II, comme la Ricine et les lectines du gui, et les lectines liant la chitine, comme WGA.

FAMILLE	LECTINE		SPECIFICITE MONOSACCHARIDIQUE	MODELE ANIMAL ET ETUDE CLINIQUE	MODE D'ADMINISTRATION	TYPE D'EFFET	REFERENCES
	Nom commun	Abréviation					
Lectines de légumineuses	Concanavoline A	ConA	Man/Glc	Cancer hépatique chez la souris SCID	Injection <i>i.v.</i> 20 mg/kg (x2)	Inhibition formation tumeur hépatique	Chang CP et al., Hepatology, 2007
				Cancer hépatique chez la souris BALB/c	Injection <i>i.v.</i> 7.5 mg/kg (x2)	Activation défenses immunes	
				Hepatectomie (2/3) chez la souris	Injection 5 mg/kg	Régénération hépatique (élimination des NKT intrahépatique)	
				Métastases colorectales hépatiques	Injection <i>i.v.</i> 50 µg (200 µl)	Inhibition formation tumeur (activation cellules NK dans le foie)	
				Mélanome B16 chez la souris	Injection <i>i.v.</i> de PEG-ConA	Activité antitumorale via lymphocytes périphériques	
					Injection <i>i.v.</i>	Cytotoxicité/Inhibition croissance via système immunitaire	
	Phytohémagglutinine	PHA	GlcNAc(1-2)Man	Cancer colorectal chez souris BALB/c Nude	Injection <i>i.v.</i> 40 µg	Ciblage de tumeur (PHA-nanocapsule)	Kasuya T et al., Human Gene Ther, 2008
				Cancer métastatique du sein (MCF7, T47D) chez souris SCID		Interaction avec cellules tumorales sur coupes histologiques	
				Cancer du sein (HBL100, BT20 et HS578T) chez souris SCID			
Peanut agglutinine	PNA	Gal/Ag T	Cancer colique (HT29, HCT116, LS174T) chez souris Nude	Application <i>i.t.</i>	Interaction avec tumeur	Sakuma et al., Eur J Pharm Biopharm, 2010	
			Cancer ovarien solide ou ascitique chez souris Nude	Injection <i>i.p.</i> 200 µg (x2)	Interaction et inhibition de la croissance tumorale	Aviczeher & Amon, FEBS Lett, 1996	
Lectines RIP de type II	Viscum album agglutinine (Mistletoe lectin)	VAA ou VCA	Gal/GalNAc	Carcinome pancréatique humain (étude clinique)	Injection <i>s.c.</i> Iscador en complément de Gemcitabine après résection chirurgicale	Diminution effets secondaires Augmentation durée de vie	Matthes et al., Curr Mol Med, 2010
				Cellules endothéliales (EA-hy926)	Administration <i>i.p.</i>	Inhibition angiogénèse	Elluru et al., Anticancer Res, 2009
				Cancer colique murin CT26	Administration orale (avant inoculation cellules cancéreuses)	Inhibition croissance tumorale via activation système immunitaire	Ma et al., World J Gastroenterol, 2008
				LAL pré-B chez souris SCID		Apoptose Augmentation durée de survie des animaux	Seifert et al., Cancer Lett, 2008
				Mélanome humain chez souris SCID	Injection <i>i.p.</i> à 30 ng/kg (200 µl)	Inhibition croissance et métastases Effets immuno-modulateurs	Thies et al., Br J Cancer, 2008
				Cancer colique (COLO) chez souris Nude		Apoptose Cytotoxicité/Inhibition croissance tumorale	Khil et al., W J Gastroenterol, 2007
				Mélanome B16 chez souris C57BL6		Inhibition croissance tumorale Augmentation sécrétion IL-12	Duong Van Huyen et al., Cancer Lett, 2006
				Cancer du sein (BT474) chez souris BALB/c	Administration <i>i.t.</i>	Cytotoxicité/Inhibition croissance	Beuth et al., Anticancer Res, 2006
				Lymphome non-Hodgkinien murin	Administration orale (10 mg/jour)	Cytotoxicité/Inhibition croissance (apoptose) Effets immuno-modulateurs	Pryme et al., Cancer Detect Prev, 2004 Pryme et al., Histol Histopathol, 2002
				Mélanome B16 chez souris C57BL6		Cytotoxicité/Inhibition croissance/Apoptose Inhibition angiogénèse Inhibition métastases	Park et al., Cancer Biother Radiopharm, 2001
				Carcinome de la vessie MB49 chez souris	Administration intravésicale (30 ou 300 ng/ml (100µl))	Cytotoxicité/Inhibition croissance	Mengs et al., Anticancer Res, 2000
				Etude clinique sur 14 patients atteints de tumeur solide	Injection <i>i.v.</i> 4 à 6 µg/kg	Effets secondaires à partir de 6 µg/kg (fatigue, fièvre)	Shoffski et al., Eur J Cancer, 2005
				Etude clinique sur 41 patients atteints de tumeur solide	Injection <i>i.v.</i> 10 à 6400 ng/kg	Effets secondaires à partir de 4 µg/kg (fatigue, fièvre, vomissements) Toxicité hépatique réversible à 6,4 µg/kg sur 2/5 patients Durée de demi-vie dans le sang de 13 min	Shoffski et al., Ann Oncol, 2004
				Métastases chez la souris SCID	Injection <i>s.c.</i> 0,3 à 150 ng/kg	Augmentation durée de survie des animaux Diminution du nombre de métastases Activation du système immunitaire	Schaffrath et al., Anticancer Res, 2001
				Cancer de la vessie induit par traitement chimique chez le rat	Administration intravésicale 30 à 150 ng (x2)	Diminution de la transformation tumorale	Elsässer-Beile et al., Cancer, 2001
Cancer ovarien humain injecté en <i>i.p.</i> chez souris SCID	Injection <i>i.p.</i> 30 à 500 ng/kg	Cytotoxicité/Inhibition croissance Augmentation durée de survie des animaux	Schumacher et al., Cancer Lett, 2000				
Lectines liant la chitine	Wheat germ agglutinine	WGA	GlcNAc	Gliome murin C6 chez le rat	Injection <i>i.v.</i> WGA associée à liposomes contenant Topotecan et Tamoxifène	Ciblage tumeur du cerveau Cytotoxicité/inhibition de la croissance tumorale in vitro Augmentation durée de vie des animaux	Du J et al., Mol Pharm, 2009
Lectines apparentées à la Jacaline	Jacaline	Jaca	Gal/Ag T	Biopsies de cancers colorectaux humains		Diagnostic de néoplasmes colorectaux	Desilets et al., Am J Gastroenterol, 1999

Tableau 4. Lectines végétales classiquement étudiées pour leurs activités antitumorales in vivo

### *I-2-2-1-1 Les lectines de légumineuses*

En ce qui concerne les bases moléculaires de la reconnaissance glycanique, les lectines de légumineuses sont les plus étudiées. Elles possèdent une remarquable activité anti-tumorale [130] en induisant *in vitro* des effets pro-apoptotiques et autophagiques sur différentes lignées de cellules cancéreuses.

Par exemple, la ConA est rapidement internalisée dans la lignée de mélanome A375 puis acheminée vers les mitochondries, induisant une signalisation apoptotique caspase-dépendante. Ce processus est accompagné d'une perte du potentiel transmembranaire mitochondrial, d'un relargage du cytochrome *c* et d'une activation des caspases [131,132]. Elle est capable d'induire spécifiquement l'apoptose de cellules déficientes en protéine suppresseur de tumeur p53, protéine généralement mutée dans les cellules cancéreuses [133,134]. Elle peut également inhiber la métalloprotéinase-2 par l'intermédiaire de TIMP-2 (tissue inhibitor of metalloproteinase-2) dans des fibroblastes ce qui contribuerait à son effet inhibiteur de la croissance tumorale [135]. Cette lectine peut également entraîner l'autophagie de cellules cancéreuses hépatiques *in vitro* et *in vivo* via une internalisation dépendante des clathrines et un adressage vers les mitochondries [122,136,137]. Enfin, *in vivo* sur des modèles murins, cette lectine possède des effets immuno-modulateurs. Elle peut induire une production de cytokines dans la tumeur et activer l'immunité spécifique via les cellules NK-T et T, conduisant à un effet antitumoral [122,136,137,138,139].

La PHA peut également induire une toxicité sur des lignées de mélanome [140]. De plus, des études ont montré qu'un régime alimentaire à base de PHA induit chez la souris une diminution de la croissance de lymphomes non-Hodgkiniens et d'ascites tumorales intrapéritonéales [141,142,143].

La PNA est étudiée dans le cadre de la recherche de nouveaux marqueurs tumoraux glycaniques. Une corrélation positive a été mise en évidence entre le niveau d'interaction de cette lectine et le stade de développement de mélanomes [144,145]. De plus, cette lectine est étudiée dans le cadre du diagnostic de cancers colorectaux et pour améliorer le ciblage de molécules anticancéreuses [146,147].

### *I-2-2-1-2 Les RIP de type II :*

Ces lectines sont constituées d'une chaîne A cytotoxique reliée par un pont disulfure à une chaîne B qui interagit avec les glycanes. La chaîne A possède une activité N-glycosidase

qui coupe les résidus adénine des ARN ribosomiques et cause l'inhibition de la synthèse protéique. La chaîne B participe à l'internalisation et à l'adressage de la chaîne A vers le système endosomal. La chaîne A est ensuite transloquée dans le cytoplasme [148]. Les lectines les plus étudiées de cette famille sont la Ricine et les lectines du gui (ou MLs pour Mistletoe lectins). La Ricine présente une cytotoxicité envers certaines lignées d'hépatome [149]. Depuis l'identification et la caractérisation des lectines du gui, les études ont montré un fort potentiel de ces principes actifs dans le traitement du cancer [150]. L'injection intratumorale de MLs dans un modèle de cancer du sein chez la souris BALB/c provoque une diminution de la masse tumorale caractérisée par une augmentation des phénomènes apoptotiques et nécrotiques [151]. L'activité des MLs réside principalement en une mort cellulaire apoptotique mitochondries-dépendante et caspases-dépendante [152,153,154,155,156]. Enfin, la lectine recombinante du gui, appelée rViscumine, a montré une activité antitumorale contre des cellules de cancer ovarien humain chez la souris SCID [157].

#### *I-2-2-1-3 Les lectines liant la chitine :*

Les lectines liant la chitine sont également étudiées dans le cadre de traitements anticancéreux. Les études cytotoxiques de cette famille de lectine se sont concentrées sur la WGA, lectine spécifique du résidu saccharidique GlcNAc. La forte expression de ce résidu est associée à des altérations de la *N*-glycosylation lors du cancer qui se manifestent sous la forme de liaisons  $\beta$ 1-6GlcNAc. Elle est connue pour inhiber *in vitro* la croissance de cellules leucémiques [158], de carcinomes colorectaux [159] et de mélanomes [140]. Ces effets cytotoxiques font intervenir une apoptose mitochondrie-dépendante et une dérégulation du cycle cellulaire [160,161].

#### *I-2-2-1-4 Les lectines du mûrier noir ou *Morus nigra* :*

Ce travail a porté sur l'étude de deux lectines apparentées à la Jacaline, Morniga G et Morniga M, issues du mûrier noir *Morus nigra*. Ces deux lectines possèdent une structure tridimensionnelle très proche mais des spécificités glycaniques différentes. Alors que Morniga G est spécifique du galactose, et plus généralement de la *O*-glycosylation, Morniga M est spécifique du Mannose, c'est-à-dire de la *N*-glycosylation.

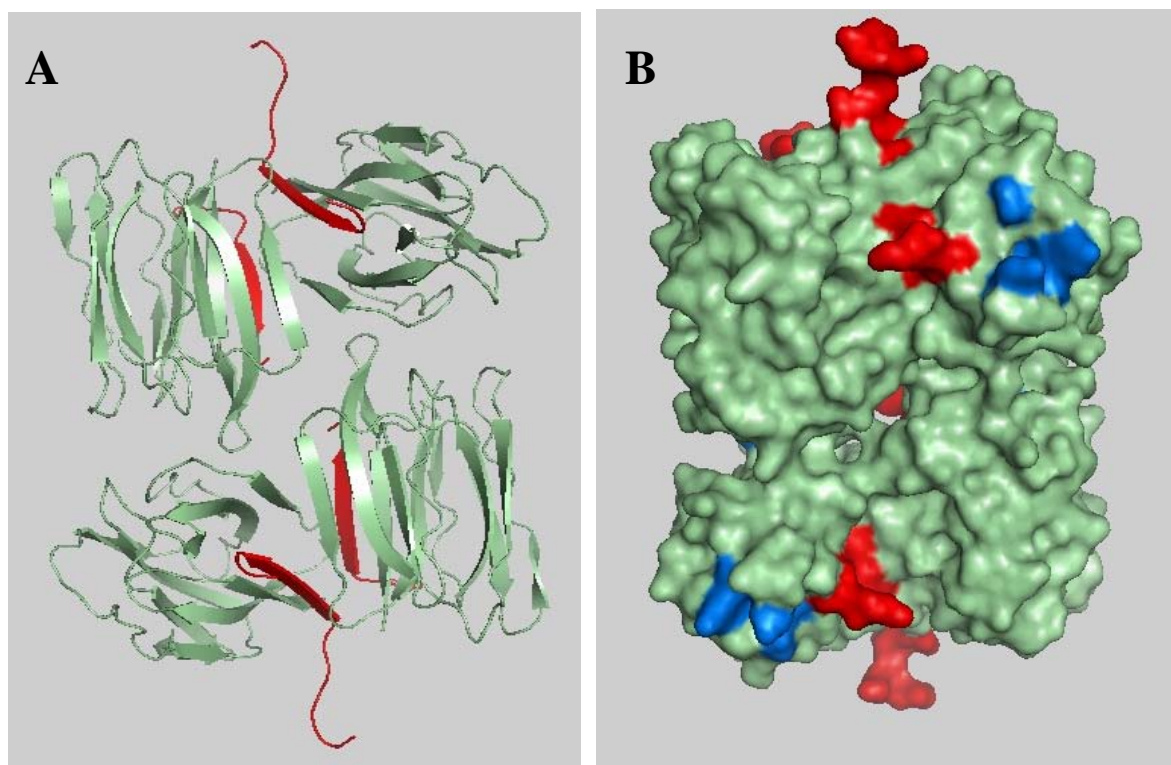
#### **I-2-2-1-4-1 Les lectines apparentées à la Jacaline ou JRLs :**

Les premiers membres de la famille des JRLs (Jacalin-related lectins) à avoir été découverts sont l'agglutinine de l'orange des Osages *Maclura pomifera* (MPA) et la Jacaline (lectine du Jackfruit ou *Artocarpus integrifolia*). Ces deux lectines, majoritairement localisées dans les graines, ont été purifiées dans les années 1980 ([162] pour MPA; [163] pour Jaca) et séquencées dans les années 1990 [164]. Par la suite, il a été montré la spécificité de reconnaissance de la Jacaline vis-à-vis de l'antigène T [165]. Depuis, il a été montré que la Jacaline est polyspécifique et qu'elle peut accommoder les antigènes Tn, sialyl-T et le core-3 (GlcNAc $\beta$ 1-3GalNAc-Ser/Thr) [166]. Les recherches sur la famille des JRLs ont été stimulées du fait des propriétés de la Jacaline. Cette lectine interagit spécifiquement avec les immunoglobulines A1, présente une activité mitogénique sur les lymphocytes [167] et possède une activité potentielle anti-VIH [168]. Ainsi, d'autres lectines de cette famille ont été découvertes, caractérisées et clonées.

La famille des JRLs est caractérisée par des lectines dont les structures sont très similaires à celle de la Jacaline. La plupart des JRLs sont constituées de quatre protomères identiques composés chacun d'une chaîne légère  $\beta$  et d'une chaîne lourde  $\alpha$  (Fig. 6). On parle de tétramère de formule  $\alpha_4\beta_4$ . Chaque protomère possède un site de reconnaissance glycanique. Cette famille de lectines est sous-divisée en deux groupes selon leur spécificité glycanique. On distingue les gJRLs des mJRLs, qui, respectivement, présentent une spécificité glycanique large vis-à-vis du galactose et du mannose [169]. Du point de vue physiologique, les études ont montré que les mJRLs seraient plutôt cytoplasmiques alors que les gJRLs seraient plutôt localisées dans les compartiments vacuolaires.

La maturation protéique de la Jacaline débute avec une pré-pro-protéine constituée d'une séquence signal de 21 acides aminés, d'un pro-peptide de 39 acides aminés, de la chaîne  $\beta$  de 20 acides aminés, d'un peptide espaceur de 4 acides aminés et de la chaîne  $\alpha$  de 133 acides aminés [170]. La Jacaline est synthétisée dans le réticulum endoplasmique et maturée de manière co-traductionnelle après la délétion du peptide signal. La pro-Jacaline est ensuite acheminée vers l'appareil de Golgi où les clivages du pro-peptide et de la séquence espaceur sont réalisés. Les deux chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  s'associent ensuite de manière non-covalente pour former un protomère. La glycosylation de la Jacaline interviendrait de manière co-traductionnelle. Le clonage du cDNA et l'analyse par southern blot de la Jacaline confirment la présence d'un mélange complexe d'isoformes codées par une famille de cinq gènes [171]. La structure tri-dimensionnelle de la Jacaline a été résolue par diffraction aux rayons X à 2.43

Å de résolution [172]. Chaque protomère est composé d'une structure en prisme  $\beta$ , constituée de trois feuillets  $\beta$  anti-parallèles, eux-mêmes constitués de quatre brins  $\beta$ . La chaîne  $\alpha$  contient les onze premiers brins et la chaîne  $\beta$  contient le douzième (*Fig. 6A*). L'oligomérisation de la Jacaline résulte en un tétramère formé apparemment par l'association non-covalente de deux dimères. Chaque chaîne  $\beta$  interviendrait fortement dans l'association non-covalente de chaque protomère. Chaque protomère possède un site de reconnaissance glycanique (*Fig. 6B*). Un réseau de neuf liaisons hydrogènes intervient dans l'interaction avec le méthyl- $\alpha$ -D-galactose. Ce réseau est formé par les acides aminés Gly1, Tyr122, Trp123 et Asp125 de la chaîne  $\alpha$  qui créent des liaisons avec les oxygènes 3, 4, 5 et 6 du méthyl- $\alpha$ -D-galactose [109]. D'après la théorie sur la plasticité des cavités de reconnaissance glycanique [109], les lectines possèdent des gradients d'affinité selon la complexité des glycanes. Par exemple, la Jacaline interagit avec les glycanes selon le gradient suivant : MeGal < Ag T/core-3 < cluster d'AgT/core-3 (**Ref**). La constante d'affinité pour les monosaccharides est de l'ordre de  $10^{-6} \text{ M}^{-1}$ , celle pour des oligosaccharides complexes est de l'ordre de  $10^{-6}$  à  $10^{-8} \text{ M}^{-1}$  et celle pour les clusters est de l'ordre de  $10^{-8}$  à  $10^{-10} \text{ M}^{-1}$ .



**Figure 6 :** Modèle tridimensionnel tétramérique de la Jacaline (1JAC). A, Représentation « cartoon », les chaînes lourdes  $\alpha$  et légères  $\beta$  sont respectivement représentées en vert et en rouge. B, Représentation « surface », les acides aminés composant les cavités de reconnaissance glycanique sont représentés en bleu.

Peu d'études en cancérologie ont été réalisées sur la famille des JRLs. En revanche, l'interaction de la Jacaline avec la protéine tyrosine phosphatase CD45 a été démontrée. En se liant à cette protéine membranaire, la Jacaline peut stimuler les lymphocytes T [173] et éliminer les lymphocytes B [174]. De plus, un effet cytotoxique de la Jacaline sur les lignées cellulaires cancéreuses épidermoïde A431 et colique HT29 a été mis en évidence. Le mécanisme cytotoxique met en jeu une interaction de la Jacaline avec des protéines chaperonnes du réticulum endoplasmique et une inhibition des voies de signalisation ERK et Akt induite par l'accumulation de la phosphatase PP2A dans le noyau [175].

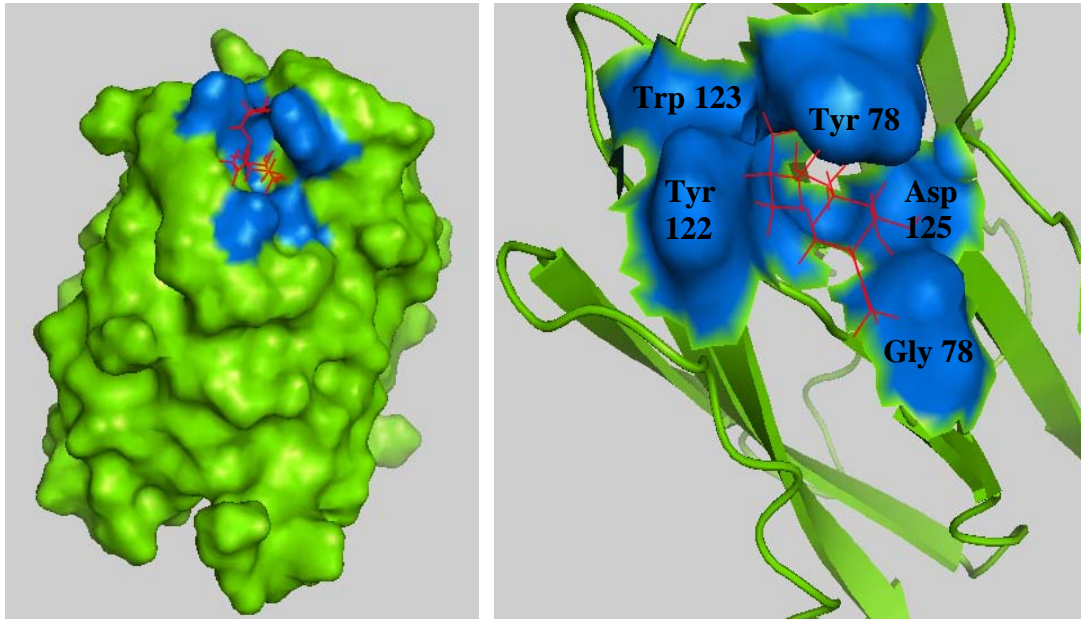
#### **I-2-2-1-4-2 Morniga M et Morniga G :**

Deux lectines majoritaires de l'écorce du mûrier noir (*Morus nigra*) ont été isolées: Morniga M (MorM) et Morniga G (MorG) [176]. Ces protéines de réserve sont régulées en fonction des saisons et sont présentes à des taux 5 fois supérieurs en hiver par rapport à l'été. La localisation subcellulaire de ces deux lectines est différente. Alors que MorG est retrouvée dans les compartiments vacuolaires, MorM est retrouvée dans le cytoplasme [176]. Les études ont montré que ces deux JRLs présentent des caractéristiques biochimiques différentes (séquence peptidique et spécificité de reconnaissance glycanique).

Le séquençage de MorG a révélé une grande identité de séquence peptidique avec la Jacaline, de l'ordre de 75% (*Fig. 7*). L'étude structurale a démontré que MorG subit le même type de maturation protéique que son homologue Jacaline (*Fig. 8*) et a permis de construire son modèle tridimensionnel (*Fig. 8*). Chaque monomère de MorG est structuré en prisme  $\beta$  et contient, comme la Jacaline, deux chaînes non covalentes  $\alpha$  et  $\beta$ . La chaîne  $\alpha$ , ou chaîne lourde (environ 16 KDa), comprend 11 brins  $\beta$ . La chaîne  $\beta$ , ou chaîne légère (environ 2 KDa), est constituée du 12<sup>ème</sup> brin  $\beta$  (*Fig. 8*). Comme son homologue Jacaline, MorG reconnaît spécifiquement les résidus de type galactose [176]. Une étude biochimique plus poussée a montré que MorG interagit spécifiquement avec la galactosamine et reconnaît avec encore plus d'affinité les clusters d'antigène Tn, c'est-à-dire le motif N-acétyl-galactosamine  $\alpha$ 1-Ser/Thr [177]. Cette interaction fait intervenir les acides aminés Gly 1, Tyr 78, Tyr 122, Trp 123 et Asp 125 (*Fig. 9*). Les constantes d'affinité de MorG pour le galactose, la galactosamine et l'antigène Tn seraient respectivement de l'ordre de  $10^{-6}$ ,  $10^{-8}$  et  $10^{-10} \text{ M}^{-1}$ .







**Figure 9 :** (A) Modèle tridimensionnel d'un monomère de Morniga G associé à l'antigène Tn (rouge). Les acides aminés participant à l'interaction avec l'antigène Tn sont représentés en bleu. (B) Modèle tridimensionnel de la cavité de reconnaissance de MorG.

MorM présente 70% d'identité de séquence avec son homologue Artocarpine (*Fig. 10*). Ces deux lectines se caractérisent également par une structure quaternaire tétramérique. Chaque monomère est constitué d'une seule chaîne polypeptidique de 12 brins  $\beta$ , formant ainsi une structure en prisme  $\beta$ . En ce qui concerne la reconnaissance glycanique, MorM et Artocarpine présentent une haute affinité pour les résidus de type mannose [176].

```

1 -----ASQTITVGSWGGPGGNGWDEGSYTGIRQIELSYKEAIG 38
2 MAGTSTNTQTGTGSQTVEVGLWGGPGGNAWDDGSYTGIREINLSHGDAIG 50
   :****: ** *****.***:*****:***: :****

1 SFSVIYDLNGDPFSGPKHTSKLP-YKNVKIELKFPDEFLESVSGYTGPF 87
2 AFSVIYDLNGQPF TGP THPGNEPSFKTVKITLDFN EFLVSVSGYTGVL 100
   :*****:***:*. : * :*.*** *.**:* ** ***** :.

1 ALATPTPVVRS LTFKTNKGR TFGPYGDEEGTYFNLPIENGLIVGFKGRTG 137
2 RLATGKD VIRSLTFKTNK-KTYGPGKEEGT PPSLPIENGLIVGFKGRSG 149
   *** . * :***** :*:***.*** * :*****:***

1 DLLDAIGIHMSL 149
2 FVVD AIGVHLSL 161
   : :*****:***

```

**Figure 10 :** Alignement des séquences de MornigaM (2) et Artocarpine (1) avec le logiciel ClustalW2.

### **I-2-2-2 Vectorisation de molécules anti-cancéreuses :**

En s'appuyant sur la spécificité de reconnaissance glycanique de certaines lectines, il est possible de les utiliser pour le ciblage de cellules tumorales. De plus, leur capacité à être endocytées en font des vecteurs intéressants qui permettraient de faciliter la délivrance intracellulaire de médicaments. Il a été montré que les cellules épithéliales du colon en contexte pathologique, tel que l'auto-immunité ou le cancer, surexpriment certains TACA comme les antigènes T, Tn et sTn. Ces glycotopes représentent des cibles potentielles pour les lectines endogènes, comme les galectines, ou exogènes, comme les lectines végétales [178]. Par exemple, il a été montré que la PNA (spécifique de l'antigène T) pourrait être utilisée comme vecteur d'agents de détection des cancers du colon. Sur un modèle de cancer colorectal murin, la délivrance de PNA couplée à un agent d'imagerie permet de distinguer les cellules cancéreuses des cellules saines environnantes [146,147]. De même, il a été montré *in vivo* l'intérêt de la PHA pour la délivrance d'ADN au niveau de tumeurs surexprimant des glycanes branchés en  $\beta$ 1-6-GlcNAc à leur surface [179]. L'intérêt de la WGA a été mis en évidence pour la délivrance d'agents anticancéreux dans des tumeurs du cerveau. L'inconvénient majeur du traitement chimiothérapeutique des tumeurs cérébrales est la difficulté des agents anticancéreux à traverser la barrière hémato-encéphalique. L'association de la WGA à des liposomes contenant du Topotecan et du Tamoxifène permet d'améliorer la délivrance de ces drogues dans des tumeurs du cerveau chez le rat [180]. L'injection *i.v.* de ces liposomes double le temps de survie de rats porteurs de gliomes.

Pour résumer, les lectines étaient considérées comme des substances toxiques uniquement destinées à être utilisées comme outils d'analyse des glycoconjugués. Cependant, des études récentes ont montré leur intérêt dans le traitement des cancers (*Tab 4*). Les lectines peuvent être injectées dans la circulation sanguine à des doses non toxiques pour l'organisme afin d'induire spécifiquement la mort de cellules tumorales par apoptose, autophagie ou en activant les défenses immunes anticancéreuses. L'apoptose semble être le mécanisme clé de l'effet toxique *in vitro* des lectines, et peut être engagée par différents mécanismes selon les lectines. De plus, leurs spécificités de reconnaissance glycanique en font des vecteurs intéressants pour le ciblage de médicaments anticancéreux.

Enfin, concernant les études cliniques, les plus nombreuses ont été réalisées avec des extraits de gui. Il existe également l'aviscumine ou rViscumine (lectine du gui recombinante) dont l'évaluation du profil santé (dose limite de toxicité, dose maximale tolérée,

pharmacocinétique, production de cytokines plasmatiques et d'anticorps dirigés contre l'avisculmine) est en cours chez des patients atteints de cancer [181]. Les mécanismes d'action antitumoraux des lectines se résument en quatre phénomènes :

- interaction membranaire et endocytose
- cytotoxicité par induction de l'apoptose ou de l'autophagie
- inhibition de la prolifération cellulaire
- stimulation du système immunitaire

## I-3 La Photochimiothérapie ou PCT

### I-3-1 Généralités :

La thérapie anticancéreuse englobe différentes techniques. La première consiste à faire une ablation de la zone tumorale de façon mécanique, c'est-à-dire l'ablation chirurgicale, ou bien physique, comme par exemple la radiothérapie. Ces techniques sont utilisées pour des tumeurs localisées [182].

La deuxième technique, largement répandue, est la chimiothérapie [183]. Celle-ci consiste à administrer, le plus souvent par voie intraveineuse (ou *i.v.*), une drogue anticancéreuse dans le but d'éliminer les cellules tumorales. Les agents utilisés sont des molécules chimiques toxiques pour les cellules vivantes qui agissent sur certains constituants cellulaires, tels que l'ADN, l'ARN ou les protéines, et bloquent la division cellulaire. Par exemple, les agents alkylants, comme le Cyclophosphamide et le Cisplatine, s'intercalent au niveau de la double hélice d'ADN et provoquent des cassures, des mutations ou des liaisons anormales, les anti-métabolites, comme le 5-Fluorouracile et le Méthotrexate, inhibent la synthèse de certains constituants cellulaires, et les agents intercalants de l'ADN, comme la Doxorubicine, perturbent la réplication et la transcription.

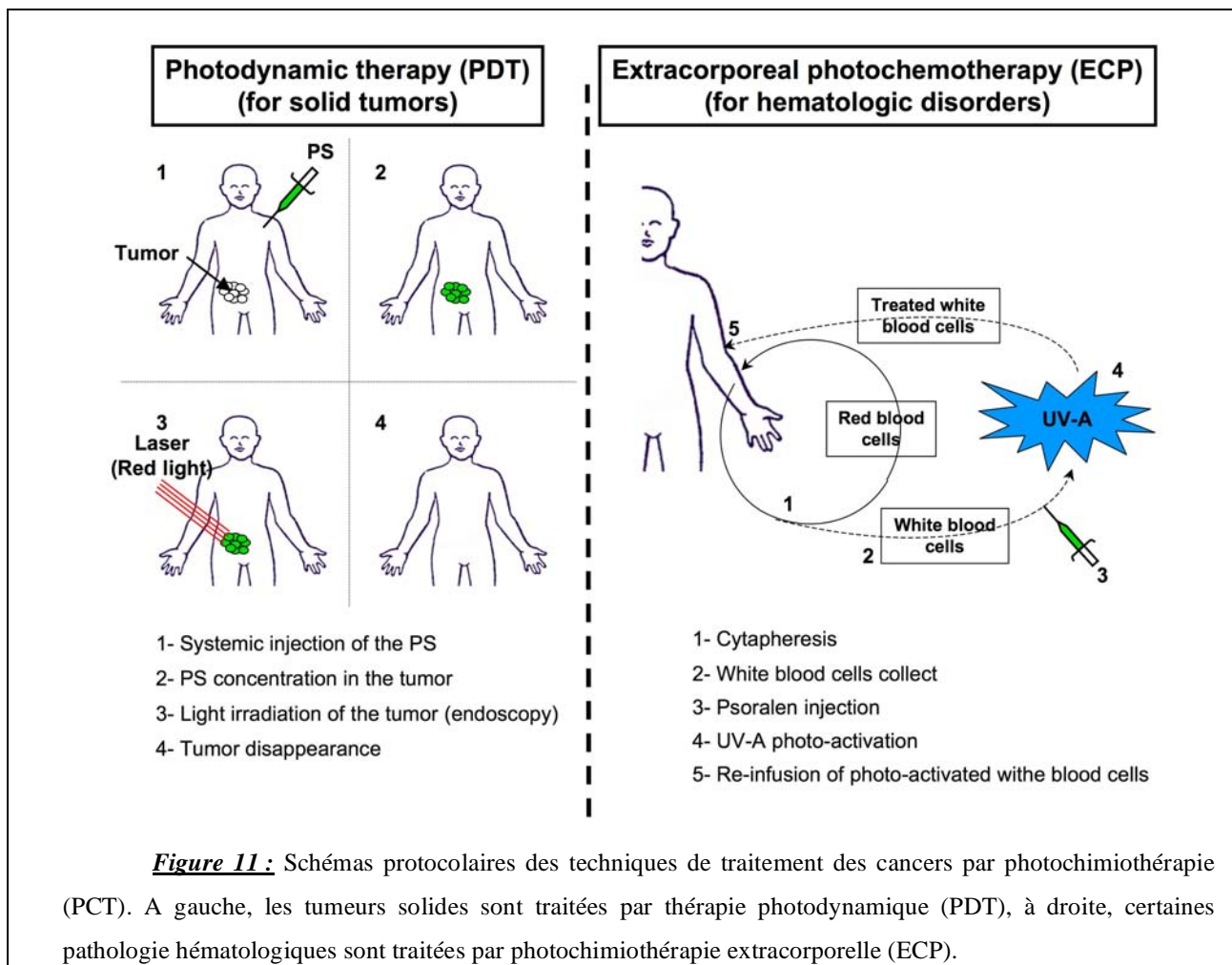
L'hormonothérapie est utilisée pour traiter des cancers hormono-dépendants, comme par exemple les cancers du sein, des ovaires, de la thyroïde ou de la prostate. Il s'agit de bloquer l'action des hormones de croissance utilisées par la tumeur. Par exemple, le Tamoxifène est un régulateur négatif des récepteurs à œstrogène, utilisé pour le traitement du cancer du sein [184].

L'immunothérapie utilise les défenses immunes anticancéreuses. Cette technique consiste à injecter en *i.v.* des anticorps monoclonaux (ou MAbs) [185], des cytokines (comme l'Il-2) ou des interférons. Par exemple, le récepteur à l'EGF (ou protéine HER2) est impliqué dans la prolifération cellulaire et surexprimé par certaines cellules tumorales. Ainsi, des MAbs anti-HER2, comme par exemple le Trastuzumab®, sont utilisés pour bloquer le récepteur et traiter des cancers hormono-dépendants, comme le cancer du sein. De même, des MAbs anti-CD20, comme le Rituximab®, sont prescrits dans le cadre de lymphome à cellules B qui expriment fortement la protéine CD20 à leur surface. En se fixant à cette protéine, les MAbs anti-CD20 induisent la mort des cellules cancéreuses par ADCC (Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity) ou par lyse cellulaire complément dépendante (CDC). Une nouvelle piste en immunothérapie est l'utilisation de MAbs anti-récepteur à TRAIL (TNF-Related

Apoptosis Inducing Ligand) puisqu'une forte proportion de cellules cancéreuses exprime ce récepteur. En mimant l'effet du ligand, les MAbs peuvent induire la mort des cellules cibles [186,187].

Un autre moyen pour lutter contre le cancer est la photochimiothérapie (ou PCT). Deux techniques de PCT sont disponibles (*Fig. 11*). La thérapie photodynamique (ou PDT) est utilisée pour le traitement de tumeurs solides [188,189]. Ce traitement est appliqué pour l'instant à des tumeurs localisées cutanées ou accessibles par endoscopie, comme par exemple les tumeurs inopérables de l'oesophage. Il est basé sur l'action conjointe de composés non toxiques à l'obscurité : un photosensibilisant (PS), la lumière (à une longueur d'onde donnée) et l'oxygène (contenu dans les tissus). Le PS est injecté dans la circulation sanguine puis capté par l'ensemble des cellules de l'organisme. Le PS se localise préférentiellement au niveau des cellules tumorales mais demeure inactif jusqu'à son exposition à la lumière du spectre du visible, c'est-à-dire entre 400 et 800 nm. L'activation lumineuse du PS provoque des réactions d'oxydation des constituants cellulaires qui aboutissent à un effet toxique pour les cellules cibles. Les patients doivent cependant attendre une clearance totale du médicament avant de pouvoir s'exposer de nouveau à la lumière du jour.

La seconde technique de PCT, appelée photochimiothérapie extracorporelle (ou ECP), est appliquée au traitement de lymphomes, comme le syndrome de Sézary, ou pour contrôler les réponses immunes pathologiques qui peuvent avoir lieu lors de la transplantation d'organes ou de maladies auto-immunes [190,191,192,193,194]. Pour cela, les cellules sanguines sont triées par cytophérèse de manière à ne récupérer que les leucocytes mononucléés (lymphocytes et monocytes). Ces cellules sont collectées dans une poche dans laquelle est injecté le PS. La poche est ensuite placée sous une source lumineuse d'ultraviolet (UV-A), dans le but d'activer le PS. Cette technique utilise des photosensibilisants dérivés du psoralène, qui, après photo-activation, se lient covalamment aux constituants cellulaires (photo-addition) et provoquent de la cytotoxicité [192].



### I-3-1-1 Historique de la PCT :

Depuis des milliers d'années, les cultures indiennes et orientales utilisaient la lumière pour traiter une large variété de maladies [195]. La notion d'action photodynamique a été initiée par O. Raab, N. Finsen et H.V. Trappeiner au début du XXe siècle. Ceux-ci ont mis en évidence que les porphyrines étaient préférentiellement captées par les cellules cancéreuses en faisant apparaître une fluorescence rouge après exposition à la lumière de longueur d'onde appropriée, introduisant le terme de **photodétection**. Dans certaines conditions, ces molécules interagissent avec l'énergie lumineuse pour entraîner la nécrose cellulaire, mettant en avant le phénomène de **phototoxicité**. L'utilisation des radiations UV de la lumière du jour pour traiter la tuberculose cutanée a abouti au prix Nobel de N. Finsen en 1903 [196]. O. Raab a montré en 1900 que l'effet conjoint de l'acridine et de la lumière est létal pour les microorganismes du genre infusoria [197]. Celui-ci a également introduit le terme de photodétection après avoir noté qu'à certaines intensités lumineuses, ces mêmes microorganismes incubés avec de l'éosine fluoresçaient. Plus tard, H.V. Trappeiner a

introduit le terme d'action photodynamique en appliquant de l'éosine sur des tumeurs cutanées puis en les irradiant en lumière blanche [198]. Celui-ci a mis en évidence la dépendance de l'oxygène dans l'activité phototoxique de ces molécules [199]. Dans la seconde moitié du XXe siècle, S. Schwartz, F. Meyer-Betz et R. Lipson ont commencé à étudier les effets phototoxiques des dérivés de l'hématoporphyrine (HpD). Dans les années 1970, T.J. Dougherty, le père fondateur de la PDT, a continué à étudier ces effets sur des cellules tumorales jusqu'à ce qu'il mette au point un mélange de dérivés de l'hématoporphyrine nommé Photofrin®, utilisé aujourd'hui en clinique. Depuis, des médicaments ont été approuvés en clinique pour le traitement de certains cancers, le Foscan®, le Metvix® ou le Levulan® (Tab. 5).

Nom commercial	Substance active	Lumière excitatrice	Application
Photofrin®	Porfimère sodique	Rouge (630 nm)	Traitement de tumeurs des bronches et de l'oesophage
Foscan®	Méta-tétrahydroxyphényl Chlorine (m-THPC)	Rouge (652 nm)	Traitement de cancers de la tête et du cou
Metvix®	Méthyl-aminolévulinate (MAOP)	Rouge	Traitement de tumeurs cutanées
Levulan®	Acide 5-aminolévulinique (5-ALA)	Rouge	Traitement de tumeurs cutanées
Hexvix®	Hexyl-aminolévulinate	Rouge	Diagnostic du cancer de la vessie
Méthoxalène®	8-Méthoxypsoralène	UV-A	Lymphomes, GVHD
Uvadex®			

**Tableau 5 :** Principaux photosensibilisants approuvés en Europe.

### I-3-1-2 Photochimiothérapie et cancer :

#### I-3-1-2-1 La thérapie photodynamique anti-cancéreuse :

La PDT est indiquée pour des tumeurs solides non opérables de relativement faible taille, cutanées ou accessibles par voie endoscopique. Actuellement, cette technique est surtout indiquée pour traiter en palliatif les cancers de la tête, du cou [200], et de l'oesophage [201]. En traitement curatif, la PDT est appliquée pour l'oesophage de Barrett, les cancers du poumon et les lésions pré-cancéreuses de la peau. La possibilité de traiter des cancers du

pancréas par cette technique est en cours d'évaluation [202]. Les PS les plus utilisés sont les PS dits de première génération dont le Photofrin® qui est le plus utilisé dans le monde et le premier à avoir obtenu l'AMM (Autorisation de mise sur le marché). En pratique, la PDT se déroule en deux phases. La première consiste à injecter le PS par voie intraveineuse pour les tumeurs internes ou à l'appliquer localement pour les tumeurs cutanées. Après le délai minimum pendant laquelle le PS se concentre dans la tumeur à des taux supérieurs à ceux des cellules saines environnantes, une irradiation lumineuse est réalisée. Pour les tumeurs internes, l'irradiation est effectuée à l'aide d'une fibre optique laser passant dans le canal opératoire d'un endoscope. Pour les tumeurs cutanées, une lampe à diodes est dirigée au niveau de la zone à traiter. L'irradiation est réalisée dans le rouge pour permettre aux rayons de pénétrer en profondeur dans la tumeur (5 à 10 mm maximum). La dose de lumière est un facteur important à maîtriser pour une efficacité maximale. Celle-ci s'exprime généralement en  $J/m^2$  (Joules/m<sup>2</sup>) et dépend de la puissance lumineuse (en Watt) et du temps d'irradiation (en Secondes).

### *I-3-1-3-2 La photochimiothérapie extracorporelle :*

L'ECP est indiquée pour le traitement de pathologies impliquant les lymphocytes T comme par exemple le lymphome de Sézary [203,204,205], et pour la prise en charge des rejets aigus d'organes après transplantation et des réactions du greffon contre l'hôte ou GVHD [206]. Dans le cas des lymphomes, les lymphocytes à traiter sont tumoraux, dans le cas de GVHD, les lymphocytes sont alloréactifs. Le principe est de réaliser une cytophérèse, de récupérer uniquement les cellules mononucléées, de les traiter par photochimiothérapie et de les réinjecter au patient. On parle également de PUV-A thérapie *ex vivo*. Aujourd'hui, deux protocoles similaires sont proposés. La technique américaine a été mise au point par la compagnie Therakos. Un seul appareil, l'Uvar XTS, assure en système clos le prélèvement, le traitement et la réinjection des cellules selon une procédure automatisée. La technique Vilbert-Lourmat a été développée en France. Dans ce cas, les trois étapes (collecte, traitement et réinjection) sont dissociées.

Actuellement, le PS le plus utilisé est le 8-méthoxypsoralène (8MOP®) qui, après activation par les UV-A (320-400 nm), crée des liaisons covalentes avec les constituants cellulaires cytoplasmiques, membranaires et nucléaires. Au niveau du noyau, le 8MOP crée des liaisons covalentes entre deux bases pyrimidiques de l'ADN. La photo-addition du 8MOP sur les constituants cellulaires aboutit au blocage de la réplication, de la transcription et de la



traduction. Ces phénomènes sont associés à une mort cellulaire apoptotique [207]. Ainsi, un mélange de cellules pathologiques et saines, dont une grande proportion est morte, est ré-injecté au patient après irradiation par les UV-A. La ré-injection des corps apoptotiques aurait des effets immunomodulateurs [208]. De plus, il a été montré que les cellules les plus sensibles à ce traitement sont les lymphocytes activés [209,210]. Ces deux observations montrent que cette technique permet de détruire préférentiellement les lymphocytes pathologiques tout en activant une réponse immunitaire après leur ré-injection. Cette technique est très bien tolérée par l'organisme et présente peu d'effets secondaires bien que de fortes doses d'UV-A puissent faire apparaître des cancers génitaux de nombreuses années après l'exposition [211].

Concernant les lymphomes T épidermotropes de type Sézary, les premiers résultats ont été obtenus par Edelson en 1987. Il obtint 75 % de réponse chez 37 patients traités en stade avancé de leur maladie mais résistants aux autres thérapeutiques [204].

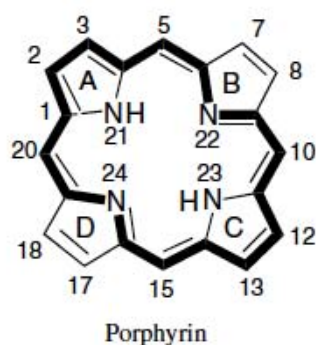
Pour la transplantation, l'ECP pourrait inhiber la réponse immunitaire des clones T du receveur contre le donneur et ainsi diminuer le rejet de greffe sans les effets secondaires des méthodes immunosuppressives. D'un autre côté, cette technique pourrait également inhiber les clones T du donneur dans la réaction du greffon contre l'hôte (GVHD), par exemple après greffe de cellules souches hématopoïétiques [210,212].

L'ECP est également utilisée pour traiter des maladies auto-immunes comme la sclérodermie, la polyarthrite rhumatoïde ou encore la maladie de Crohn [194]. Tous ces résultats restent tout de même à être approfondis et confirmés en cliniques sur de plus grandes séries de patients. La connaissance plus précise du mécanisme d'action permettra d'élargir les applications dans le but de diminuer l'utilisation des traitements immunosuppresseurs.

### ***I-3-2 Les photosensibilisants :***

Les porphyrines sont les PS les plus communs et ont été les plus utilisées dans l'évaluation de l'efficacité de la PDT face au cancer [213,214]. Elles sont considérées comme les PS de première génération et présentent des inconvénients comme une faible capacité à absorber l'énergie lumineuse et une photosensibilité accrue de la peau. Depuis, les recherches se focalisent sur de nouveaux PS présentant de meilleures caractéristiques pharmacologiques et photophysiques [215]. Ces PS de seconde ou de troisième génération permettent de diminuer les désavantages des premiers et d'augmenter leur efficacité [216]. Le coût et la facilité de préparation sont également des critères importants pour la sélection de PS

utilisables en PCT. Les PS sont classés en deux groupes : les PS porphyriniques (comme les chlorines et les phtalocyanines) et non-porphyriniques (comme l’hypericine et le bleu de méthylène) [216]. Les PS porphyriniques sont les plus étudiés et sont tous composés d’un cycle tétrapyrrolique constitué d’un système de 18 électrons  $\pi$  (Fig. 12). Un PS intéressant pour une utilisation en PCT sera un composé pur, stable et non toxique en l’absence de lumière. Ce PS doit également pouvoir s’accumuler le plus sélectivement possible au niveau du tissu cible et être éliminé suffisamment vite de l’organisme afin d’éviter au maximum la photosensibilisation de la peau. Un PS avec un rendement en espèces réactives de l’oxygène le plus grand possible sera préféré. Le PS ne doit pas former d’aggrégats, puisque l’aggrégation modifie les propriétés photophysiques du PS. Enfin, le PS le plus adapté pour la PCT aura une longueur d’onde d’excitation la plus grande possible afin de pouvoir être activé en profondeur et devra absorber le plus fort possible la lumière afin de diminuer au maximum les temps d’irradiation.



**Figure 12 :** Structure du noyau tétrapyrrolique.

*Les PS de 1<sup>ère</sup> génération :* Les plus connus sont l’hématoporphyrine (Hp) et ses dérivés (HpD). Scherer, dans la première moitié du XIXe siècle, a découvert et produit un composé provenant du sang nommé Hématoporphyrine (Hp). Il a été montré que ce composé possède la propriété d’être fluorescent, et qu’il peut être utilisé pour le diagnostic de cancers. Des dérivés de ce composé, appelés HpD, ont montré une accumulation préférentielle dans les tissus tumoraux [217]. Une première étude clinique a montré l’efficacité de ce traitement sur 25 patients atteints de tumeurs malignes cutanées ou sous-cutanées. L’administration *i.v.* de l’HpD (2,5 à 5 mg/kg), suivie d’une irradiation en lumière rouge 3 jours après, a permis de traiter complètement ou partiellement 111 tumeurs sur 113 [218]. Les tumeurs traitées incluaient des cancers du sein, du colon, de la prostate et des mélanomes. L’HpD le plus communément utilisé en clinique est le Photofrin® (qui correspond à la fraction purifiée de

l'HpD). Ce composé est un mélange d'oligomères d'Hp, préparés par traitement chimique et purifiés par HPLC, dont la composition exacte est encore inconnue. Ces composés s'accumulent peu dans les tumeurs et présentent une longue durée de photosensibilité de la peau (1 à 2 mois). De plus, il est difficile d'activer le Photofrin® dans les longueurs d'onde correspondant au rouge à moins d'augmenter très fortement les doses de lumière et de PS, augmentant les effets secondaires [188]. Ce composé est principalement utilisé pour des cancers de l'œsophage.

*Les PS de 2<sup>ème</sup> génération* : Ces composés synthétiques ou semi-synthétiques (comme par exemple, le Foscan® ou m-THPC, les phtalocyanines et les phéophorbides) ont été produits dans le but de dépasser les limites des PS de première génération (Tab. 6). Ceux-ci possèdent un fort coefficient d'extinction molaire tout en gardant une longueur d'onde d'activation dans la fenêtre du rouge (650-800 nm), un haut rendement de production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et une clearance rapide. Tous ces PS dérivent d'une structure tétrapyrrolique de type chlorrine ou phtalocyanine à laquelle peuvent être ajoutés des substituants. Par exemple, l'ajout de quatre substituants de type hydroxyphénol sur la structure porphyrinique, donnant le Foscan®, permet de diminuer de 100 fois les doses de lumière et de PS pour avoir un effet comparable à celui du Photofrin® [219]. De plus, le système cyclique d'électrons  $\pi$  peut être élargi afin d'augmenter la longueur d'onde d'absorption maximale et, généralement, le rendement en oxygène singulet. Par exemple, l'addition de quatre cycles benzènes sur la structure tétrapyrrolique des porphyrines produit les phtalocyanines. Comme ces PS absorbent très fortement la lumière rouge, des doses plus faibles (0,2-0,5 mg/kg) sont utilisées en PDT en comparaison de celles utilisées avec le Photofrin®. Ainsi, les problèmes de photosensibilisation de la peau sont largement diminués. Enfin, un PS très prometteur est le Tookad. Il s'agit d'un bactério-phéophorbide métallé dont la longueur d'onde d'excitation maximale de 763 nm est associée à un grand coefficient d'extinction molaire (environ  $10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) [220]. L'efficacité du traitement PDT par le Tookad a été étudiée *in vivo* dans un modèle murin de cancer de la prostate. L'élimination de la tumeur xéno greffée intervient chez 50 % des animaux traités [221]. Plus récemment, une étude clinique de phase III avec ce composé a été réalisée chez des patients atteints d'un cancer de la prostate [222].

Type de composé	$\lambda_{\text{max}}$ (nm)	$\epsilon$ ( $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )
Porphyries	620-640	$3,5 \cdot 10^3$
Porphyries méso-substituées	650	$18 \cdot 10^3$
Phtalocyanines	700	$200 \cdot 10^3$
Naphthalocyanines	780	$350 \cdot 10^3$
Porphycènes	610-650	$50 \cdot 10^3$
Chlorines	680	$40 \cdot 10^3$
Bactérochlorines	780	$150 \cdot 10^3$

**Tableau 6 :** Position de la bande d'absorption dans le rouge de différents PS de 2<sup>nd</sup>e génération.

*Les PS de 3<sup>ème</sup> génération :* Ce sont des PS couplés à un vecteur ciblant les tumeurs. Ces vecteurs sont d'origine protéique/peptidique, glycanique ou lipidique (cf. chapitre I-3-4). Les PS de 3<sup>ème</sup> génération sont de plus en plus étudiés en raison du manque de sélectivité des PS de 1<sup>ère</sup> et 2<sup>ème</sup> génération. Cependant, à part Visudyne®, une formulation de Vertéporfine (ou benzoporphyrine) contenu dans des liposomes, qui est utilisé pour le traitement de la dégénérescence maculaire liée à l'âge, aucun PS de 3<sup>ème</sup> génération n'est actuellement utilisé en clinique pour le traitement de cancers.

### **I-3-3 Mécanisme d'action de la PCT :**

La réaction photodynamique implique un composé photosensible, la lumière et l'oxygène moléculaire. Lorsque le PS est activé par la lumière, celui-ci peut réagir avec l'oxygène contenu dans les cellules, entraînant l'oxydation de constituants cellulaires [223].

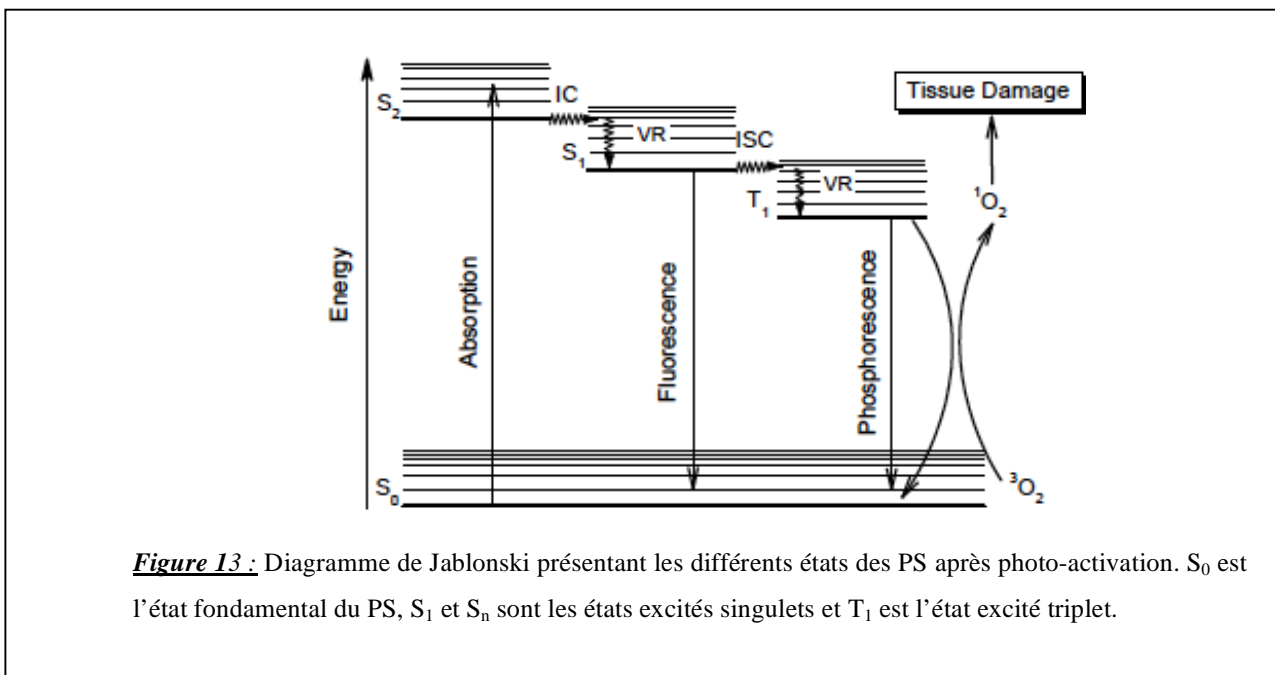
#### **I-3-3-1 La photo-activation dans le visible :**

Les PS utilisés en PDT sont des molécules photoactivables qui ont la capacité de transférer de l'énergie lumineuse à l'oxygène moléculaire pour générer des espèces réactives de l'oxygène (ROS).

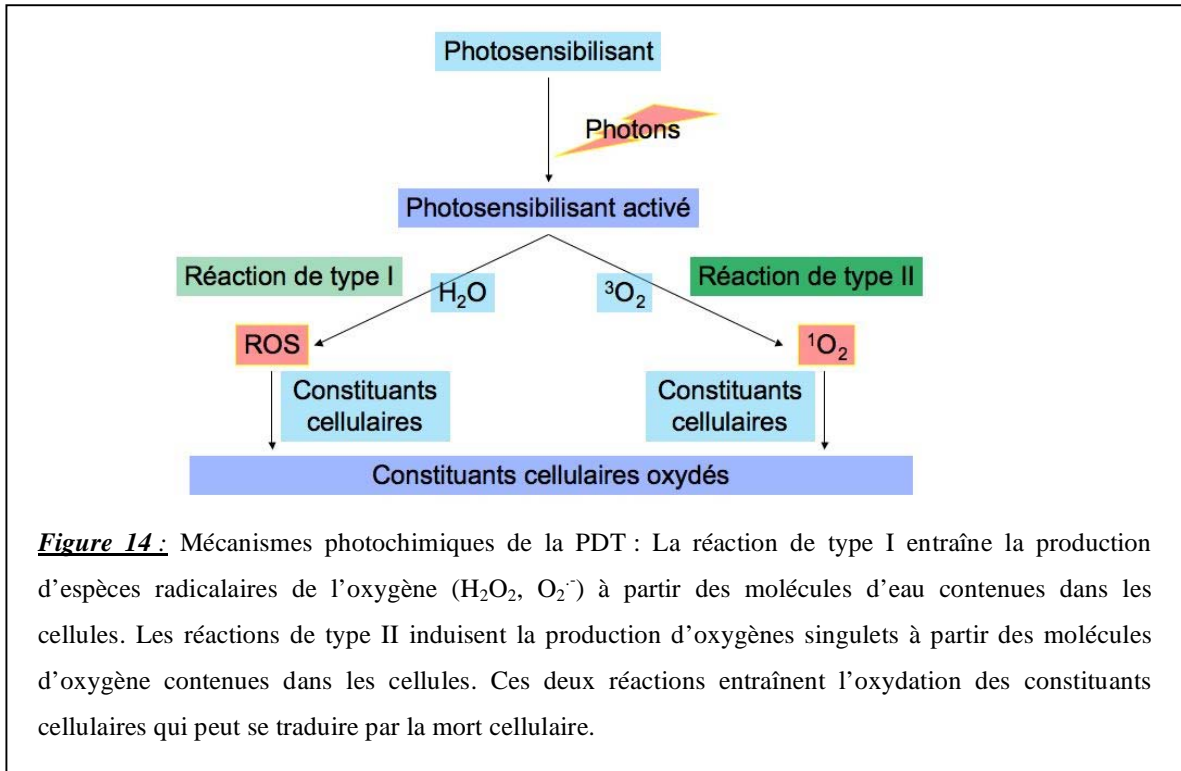
Les photons interagissent avec les PS ce qui aboutit au passage de celui-ci d'un état fondamental vers des états excités (*Fig. 13*). L'absorption de lumière provoque le passage du PS vers un état excité singulet  $S_n$ . Le passage de l'état singulet  $S_1$  à l'état excité singulet  $S_0$  est accompagné d'une production de fluorescence. Le passage de l'état excité triplet  $T_1$  à l'état triplet  $S_0$  est accompagné d'une phosphorescence. Après des réactions de croisement

intersystème de l'état triplet, le PS peut réagir avec l'oxygène par transfert d'énergie, générant des oxygènes singulets ( $^1\text{O}_2$ ) (réaction de type II) ou bien peut réaliser des transferts d'électrons conduisant à la production d'espèces radicalaires comme les anions superoxydes ( $\text{O}_2^-$ ), ou au peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (réaction de type I) (Fig. 14). Ces deux types de réactions conduisent à des dommages cellulaires et peuvent entraîner la mort cellulaire.

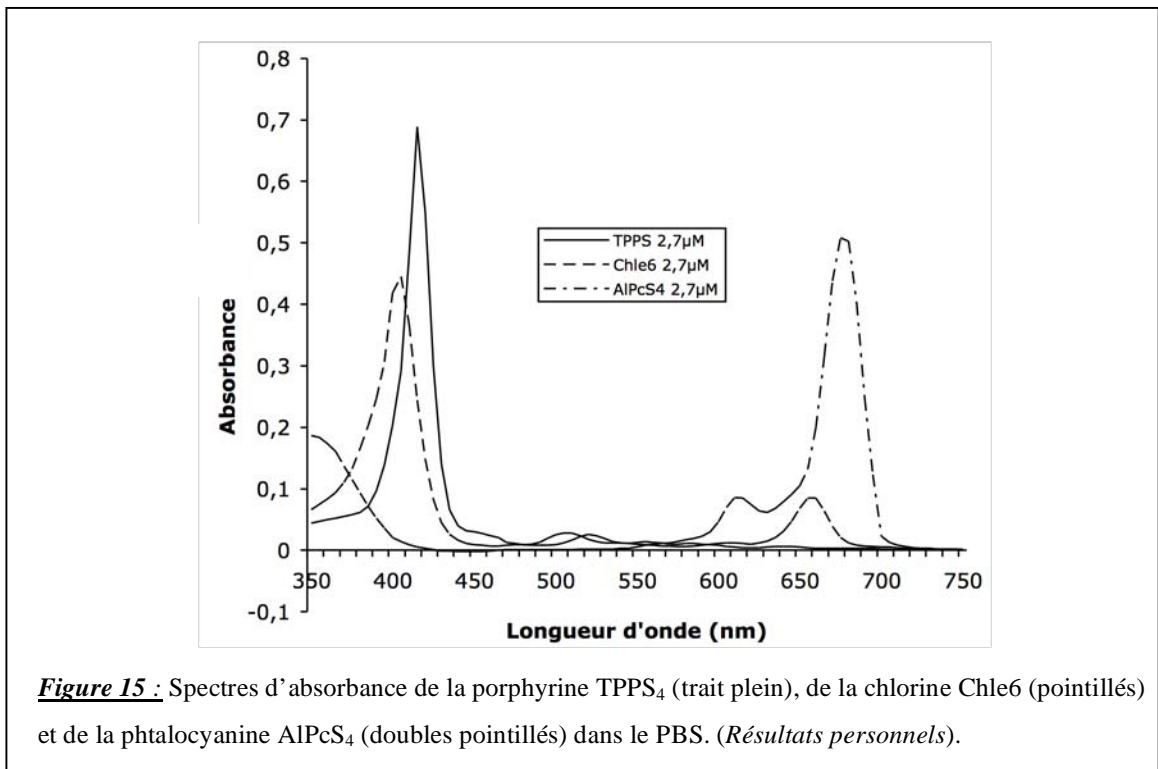
Les PS présentent des spectres d'absorbance caractéristiques, constitués d'une bande d'absorbance dans les longueurs d'onde de la lumière bleue (400-450 nm) appelée bande de Soret et de bandes d'absorbance secondaires (500-800 nm) appelées bandes Q. La longueur d'onde d'absorption et l'amplitude de la bande de Soret varie selon la structure chimique des PS (Fig. 15). En effet, alors que les porphyrines absorbent un maximum de lumière au niveau de la bande de Soret, les phtalocyanines absorbent un maximum de lumière dans les longueurs d'onde de la lumière rouge (650-700 nm). La fenêtre thérapeutique la plus adaptée pour l'activation des PS est la lumière rouge en raison de l'absorbance des chromophores endogènes (Fig. 16). D'autre part, plus la lumière excitatrice possède une longueur d'onde dans le rouge lointain, plus les photons pénètrent en profondeur dans les tissus (630 nm : pénétration des photons de 1 à 2 mm ; 700-850 nm : pénétration des photons de 5 à 10 mm).



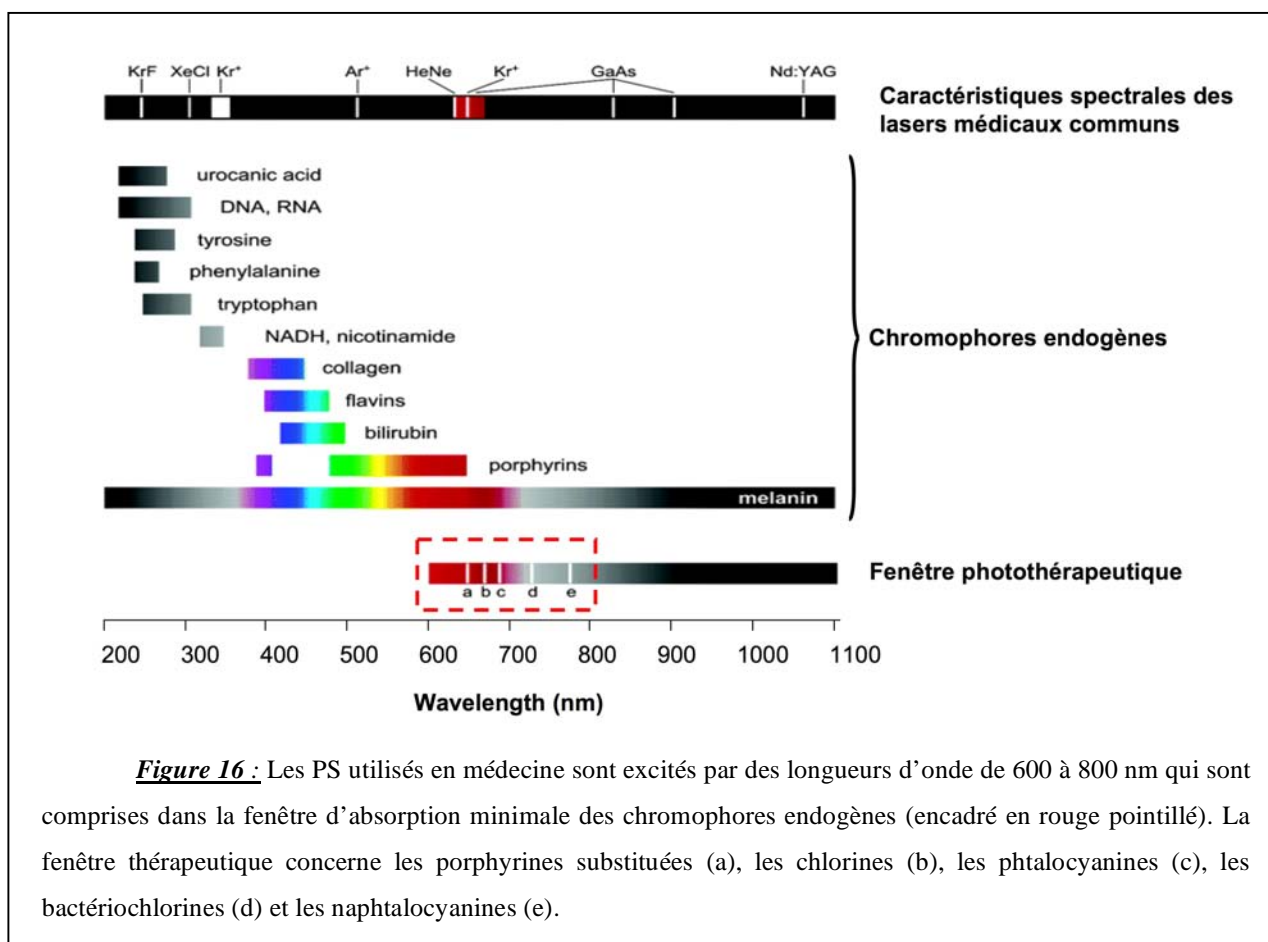
**Figure 13 :** Diagramme de Jablonski présentant les différents états des PS après photo-activation.  $S_0$  est l'état fondamental du PS,  $S_1$  et  $S_n$  sont les états excités singulets et  $T_1$  est l'état excité triplet.



**Figure 14 :** Mécanismes photochimiques de la PDT : La réaction de type I entraîne la production d'espèces radicalaires de l'oxygène ( $H_2O_2$ ,  $O_2^{\cdot-}$ ) à partir des molécules d'eau contenues dans les cellules. Les réactions de type II induisent la production d'oxygènes singlets à partir des molécules d'oxygène contenues dans les cellules. Ces deux réactions entraînent l'oxydation des constituants cellulaires qui peut se traduire par la mort cellulaire.



**Figure 15 :** Spectres d'absorbance de la porphyrine TPPS<sub>4</sub> (trait plein), de la chlorine Chle6 (pointillés) et de la phtalocyanine AIPcS<sub>4</sub> (doubles pointillés) dans le PBS. (Résultats personnels).



### I-3-3-2 Mécanismes cellulaires induits par la PDT:

Lorsque les PS sont au contact des cellules cibles, leur photo-activation peut déclencher une mort cellulaire nécrotique, apoptotique et/ou autophagique [224,225]. Le type de mort induite après PDT dépend du type cellulaire, de la dose photodynamique (qui dépend du PS, de sa concentration et de la dose lumineuse) [226] et de la localisation intracellulaire du PS [227,228,229]. De plus, dû à leur faible durée de demi-vie et donc à leur faible distance de diffusion, les dommages induits par les ROS sont localisés à proximité du PS [230]. Des PS localisés majoritairement au niveau de la membrane plasmique causeront une perte de l'intégrité membranaire et déclencheront plutôt de la nécrose alors que des PS localisés dans le cytoplasme ou dans d'autres organites aboutiront à d'autres phénomènes comme l'apoptose ou l'autophagie. De même, il a été rapporté que des faibles doses de Calphostin induisent de l'apoptose alors que des fortes doses induisent de la nécrose après photoactivation [231]. Enfin, il a été rapporté l'activation d'une réponse immunitaire post-PDT qui favorise l'effet du traitement [232,233]. Il a été montré l'augmentation du nombre de cellules immunitaires au niveau de la tumeur traitée par le Photofrin® puis irradiée [234].

### *I-3-3-2-1 PDT et apoptose des cellules cancéreuses :*

La mitochondrie joue un rôle central dans l'apoptose (ou PCD I pour Programmed Cell Death) induite par la PDT (*Fig. 17*) [235,236]. En effet, elle est à ce jour considérée comme l'inducteur principal de l'apoptose, pour les PS qui la cible, et comme étape importante de la mort déclenchée à partir d'autres organites cellulaires. Dans ce deuxième cas, la mitochondrie servirait de boucle d'amplification de l'apoptose [225].

#### **I-3-3-2-1-1 Rôle prépondérant de la voie intrinsèque et de la mitochondrie :**

Il a été observé que la photosensibilisation de lignées cellulaires cancéreuses par différents PS induit une augmentation de l'expression membranaire des systèmes ligand/récepteur de mort tels que Fas/FasL *in vitro* [231,235,237,238] et *in vivo* [239,240,241] ou TRAIL/TRAIL-R [242]. Certaines études montrent que la participation du DISC (Death Inducing Signaling Complex) et des caspases initiatrices est nécessaire à la cytotoxicité induite par la PDT [237,238,243,244]. Le DISC est le complexe protéique membranaire qui initie l'apoptose en activant les caspases initiatrices-8 et -10 [245]. En revanche, le z-VAD, un inhibiteur à spectre large des caspases, ne prévient pas la perte du potentiel membranaire mitochondrial, indiquant que les effets retrouvés au niveau de la mitochondrie peuvent précéder l'activation des caspases [246]. La majorité des études montrent l'implication de la voie apoptotique intrinsèque mitochondriale caractérisée par la perte du potentiel membranaire mitochondrial et l'implication des protéines de la famille Bcl-2, le relargage du cytochrome c et l'activation des caspases effectrices -9 et -3 [231,236,243,244,247,248,249,250]. Tous ces résultats mettent en avant le rôle important de la mitochondrie dans la mort cellulaire induite par la PDT.

#### **I-3-3-2-1-2 Rôle du céramide :**

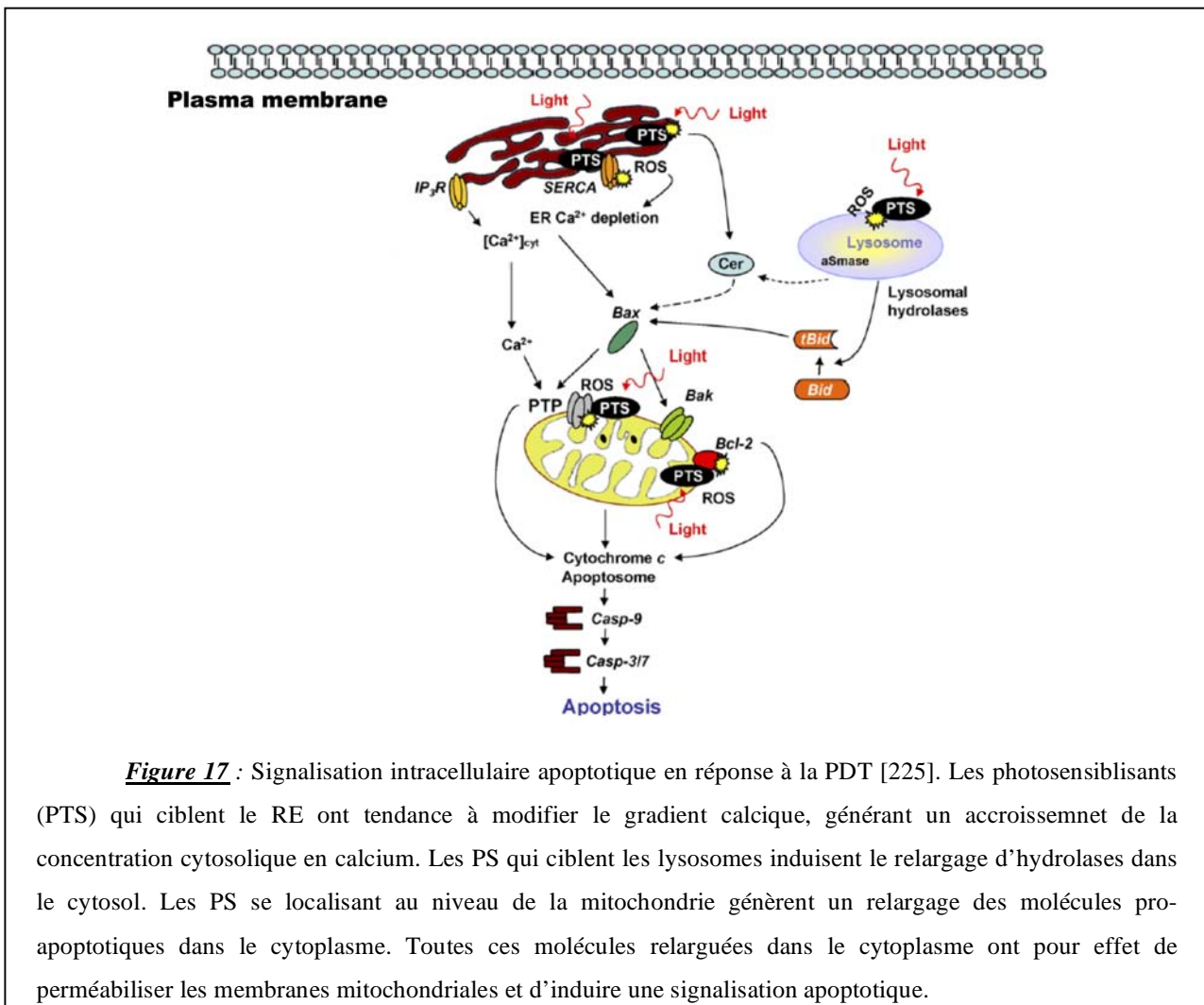
Un autre mécanisme induit par la PDT est l'augmentation du taux de céramide [228,251,252]. Il est connu que ce sphingolipide joue un rôle important dans l'initiation de la mort cellulaire apoptotique [253]. Le céramide est synthétisé à partir de l'hydrolyse de la sphingomyéline par la sphingomyélinase ou peut être utilisé pour générer de la sphingomyéline grâce à la sphingomyéline synthase. De façon intéressante, les lymphoblastes de Niemann-Pick, qui sont déficients en sphingomyélinase acide sont résistants à la PDT [254]. De plus, la surexpression de la sphingomyéline synthase 1 abolit la production de céramide et génère la résistance des cellules à la mort cellulaire induite par la PDT [255].



### I-3-3-2-1-3 Mécanismes apoptotiques indépendants des caspases :

Il existe également des voies de signalisation apoptotiques dépendantes de la mitochondrie mais ne faisant pas intervenir les caspases. Par exemple, lorsque l'apoptose caspase-dépendante est inhibée, il a été montré que le traitement PDT peut induire une signalisation apoptotique par l'intermédiaire du relargage de la protéine mitochondriale AIF (apoptosis inducing factor) [256,257].

Il a également été rapporté un rôle de la photo-oxydation de la pompe à calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) (SERCA pour Sarco(endo)plasmic-reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase) localisée au niveau du RE [228]. Cette protéine régule l'homéostasie du  $\text{Ca}^{2+}$  au niveau du RE, et sa perte de fonction entraîne une modification du gradient calcique entre RE et cytoplasme. Cette modification peut activer des signalisations autophagiques et apoptotiques [258]. Récemment, il a été montré l'implication de la protéine Bid dans la phototoxicité induite par des PS qui ciblent les lysosomes. Bid serait clivé par le relargage des hydrolases lysosomales, permettant le déclenchement de l'apoptose mitochondrie-dépendante [259,260].



### *I-3-3-2-2 PDT et autophagie des cellules cancéreuses :*

L'autophagie (PCD II) contrôle la qualité des constituants cellulaires et permet le maintien du métabolisme et de la survie cellulaire en cas de stress. Ce processus cellulaire permet par exemple de retirer les organites dysfonctionnels, les métabolites toxiques ou les pathogènes intracellulaires. Il se résume en trois étapes : (1) formation de vacuoles (autophagosome) qui séquestrent le matériel cytosolique à dégrader, (2) maturation de l'autophagosome en vacuoles dégradatives et fusion avec le lysosome, et, (3) dégradation du matériel séquestré par les enzymes lysosomales. Cependant, ce processus cytoprotecteur peut, dans certaines conditions de stress excessif, devenir un mécanisme de mort cellulaire indépendant ou synergisant avec l'apoptose.

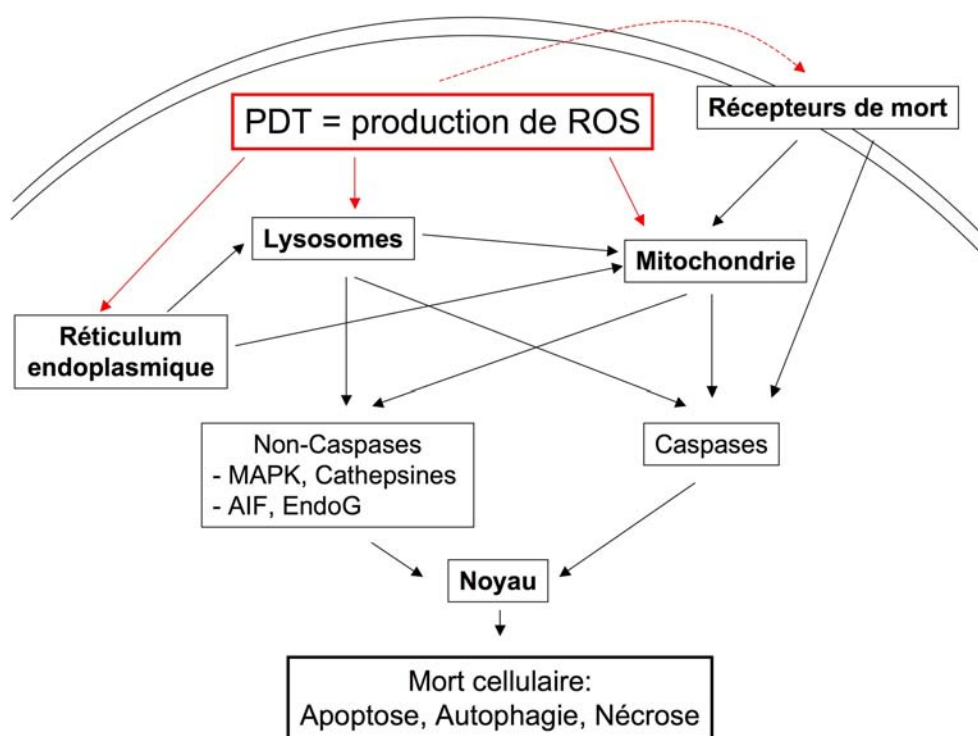
Lorsque l'apoptose est bloquée, l'autophagie entraîne une signalisation aboutissant à la mort cellulaire en réponse à la PDT [261]. De plus, l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques de la PI3K de classe III (enzyme impliquée dans la séquestration du matériel cytoplasmique à dégrader) peut résulter en une inhibition de la mort cellulaire [258]. En revanche, lorsque les cellules ne sont pas déficientes pour l'apoptose, l'autophagie peut endosser un rôle de survie [262]. Les ROS produits par les réactions photodynamiques sont très réactifs. Il est possible que l'autophagie soit activée pour éliminer les constituants cellulaires endommagés qui ne peuvent pas être dégradés par le protéasome (organites dysfonctionnels, agrégats protéiques, ...) et favoriser la survie cellulaire. En effet, tandis que la PDT de cellules déficientes pour Atg7, gène impliqué dans la formation de l'autophagosome, entraîne 20% de mort cellulaire, la PDT sur des cellules identiques possédant Atg7 n'entraîne que 5% de toxicité [263].

### *I-3-3-2-3 PDT et nécrose des cellules cancéreuses :*

La nécrose résulte d'une catastrophe bioénergétique irréversible caractérisée par la vacuolisation et le gonflement du cytoplasme entraînant la rupture de la membrane plasmique. Cette perte d'intégrité membranaire a pour conséquence le relargage des constituants cellulaires et notamment de molécules pro-inflammatoires. Lorsque la dose de PDT est forte, la nécrose semble être la mort cellulaire dominante quelque soit la localisation des PS [225].

En conclusion, la PDT induit un mélange de morts cellulaires programmées via l'oxydation des constituants cellulaires. Ces types de mort sont dépendants de la localisation

des PS, du type cellulaire et de la dose photodynamique. Les PS se localisant au niveau des membranes peuvent entraîner l'oxydation des constituants de la membrane plasmique et induire de la nécrose. Le mécanisme apoptotique photo-induit fait intervenir différentes voies de signalisation dépendantes ou non des caspases, dont l'acteur central est la mitochondrie. Celle-ci amplifie les signaux apoptotiques en relarguant des molécules pro-apoptotiques dans le cytoplasme, telles que le cytochrome *c* et/ou le facteur pro-apoptotique AIF. Le ciblage des lysosomes peut induire un mélange de mort cellulaire apoptotique et autophagique. A de faibles doses de PDT, l'autophagie semble endosser un rôle de survie, alors qu'à fortes doses de PDT, celle-ci active des signaux de mort cellulaire (Fig. 18).



**Figure 18 :** Les ROS produits après PDT peuvent être localisés dans différents compartiments subcellulaires, induisant différents mécanismes de mort cellulaire.

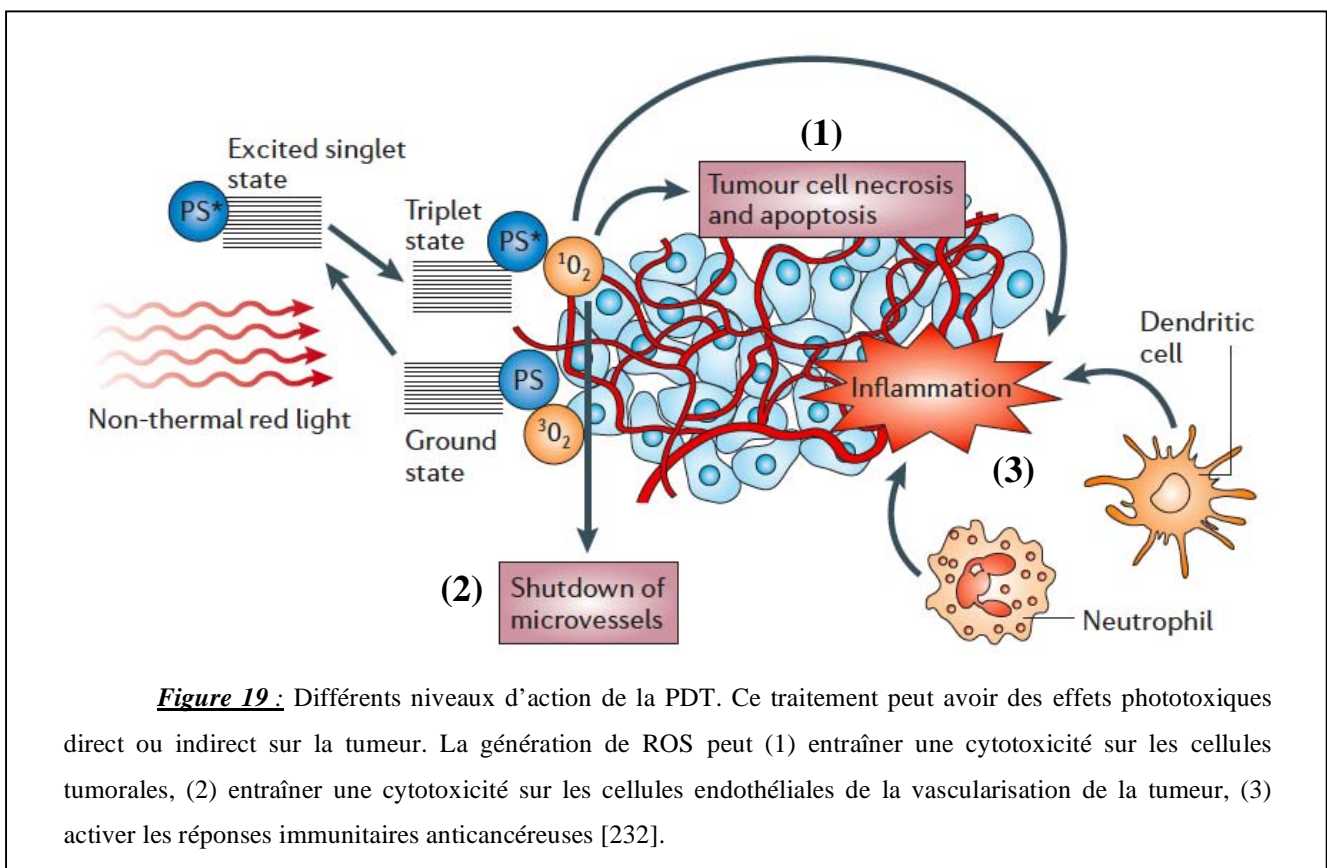
### I-3-3-3 Mécanismes cellulaires induits par l'ECP:

L'irradiation lumineuse des dérivés du psoralène provoque une photo-addition des PS sur les constituants cellulaires, et en particulier sur l'ADN. Ce phénomène aboutit à la mort des cellules pathologiques par un mécanisme apoptotique [207,208]. Les signalisations intracellulaires cytotoxiques induites par la PUV-A thérapie sont encore méconnues. Elle

mettent en avant un rôle précoce de la mitochondrie et un rôle plus tardif des caspases chez des patients atteints de lymphomes T cutanés [264]. Les corps apoptotiques sont suspectés d'être à l'origine de l'effet vaccinant de l'ECP. Ils seraient reconnus et phagocytés par les cellules dendritiques (ou DCs). Les antigènes correspondants seraient exprimés par les molécules du CMH à la surface des DCs, conduisant à l'activation des défenses immunitaires [265].

### I-3-3-4 Autres cibles cellulaires de la PCT : effets indirects

Les ROS produits après activation des PS induisent une destruction de la tumeur par différents mécanismes (*Fig. 19*). La PDT peut avoir un effet cytotoxique direct sur la tumeur ou un effet toxique indirect par la destruction de la vascularisation tumorale et l'activation d'une réponse immunitaire [188,232].



**Figure 19 :** Différents niveaux d'action de la PDT. Ce traitement peut avoir des effets phototoxiques direct ou indirect sur la tumeur. La génération de ROS peut (1) entraîner une cytotoxicité sur les cellules tumorales, (2) entraîner une cytotoxicité sur les cellules endothéliales de la vascularisation de la tumeur, (3) activer les réponses immunitaires anticancéreuses [232].

#### *I-3-3-4 -1 Cytotoxicité au niveau de la vascularisation de la tumeur :*

En créant des dommages au niveau des cellules de l'endothélium vasculaire tumoral, la PDT entraîne une thrombose et donc une diminution de l'apport en oxygène et en nutriments dans la tumeur, conduisant à une inhibition de la croissance tumorale [266]. Ce phénomène entraîne la nécrose tumorale et peut favoriser une réponse inflammatoire localisée. Ce processus a récemment été mis en évidence dans des modèles murins traités par le Tookad [221] ou la bactériochlorine WST11 [267].

#### *I-3-3-4 -2 Activation des défenses immunes :*

Contrairement aux approches anticancéreuses classiques qui sont généralement immunosuppressives, la PDT peut activer les défenses immunes anticancéreuses [232]. Cet effet serait en partie dû à une infiltration de la tumeur par des cellules myéloïdes activées et à l'activation d'une réponse immune lymphoïde spécifique [233,268]. Par exemple, une étude clinique récente réalisée chez des patients atteints de carcinomes baso-cellulaires a montré l'augmentation de la réactivité des cellules immunes à un antigène spécifique de ce type de cancer après traitement PDT [269]. De plus, l'injection des cellules H22 traitées par PDT dans un modèle de cancer hépatique H22 murin provoque un effet immunostimulant et antitumoral [270].

### ***I-3-4 Ciblage des PS :***

Les caractéristiques physicochimiques du PS et le protocole utilisé lors du traitement PCT déterminent la localisation de l'effet photodynamique. La nature du PS (de 1<sup>ère</sup>, 2<sup>ème</sup> ou 3<sup>ème</sup> génération) détermine sa biodistribution, ses caractères photophysiques, et sa durée de vie dans l'organisme. Le protocole de PCT est modulable sur l'intervalle de temps entre l'injection du PS et l'irradiation et sur les doses de lumière et de PS. Un intervalle de temps court entre l'injection du PS et l'irradiation aura plutôt un effet sur la vascularisation tumorale, alors qu'un temps long entre l'injection du PS et l'irradiation, permettant l'accumulation du PS au niveau du tissu tumoral, aura plutôt un effet direct sur la tumeur [271]. Il est également nécessaire d'avoir un PS dont la clearance est assez élevée, c'est-à-dire qui peut être assez rapidement éliminé de l'organisme, afin d'éviter au maximum les effets secondaires, mais dont la durée de vie lui permette d'atteindre la tumeur. Ainsi, pour augmenter l'efficacité de la PCT, il est nécessaire d'optimiser la stabilité, l'activité

photodynamique et le ciblage des PS au niveau de l'environnement tumoral. Pour cela, la structure moléculaire peut être modifiée afin de faire varier les caractères physicochimiques du PS. Celui-ci peut être emprisonné dans des nanoparticules afin de le rendre stable et hydrophile. Le PS peut également être couplé de façon covalente à des molécules vectrices, comme par exemple les glycanes, les peptides ou les anticorps, pour optimiser son accumulation au niveau de l'environnement tumoral. Le ciblage est passif lorsqu'il est réalisé par les caractéristiques physicochimiques du PS, et actif lorsqu'il est assuré par une molécule vectrice. En plus d'être extracellulaire, le ciblage peut également concerner des compartiments subcellulaires plus ou moins sensibles à l'action photodynamique (lysosomes, mitochondries, noyau).

#### **I-3-4-1 Ciblage passif :**

Les nanoparticules sont étudiées dans le but d'améliorer la délivrance des PS. Ils permettent d'éviter l'aggrégation de certains PS hydrophobes dans les milieux aqueux, afin d'augmenter leur activité phototoxique. Ainsi, leur formulation dans des nanoparticules leur permet d'être injectés dans la circulation sanguine [272,273]. D'autre part, la taille des particules est un facteur important puisqu'il a été rapporté que l'activité phototoxique du dérivé de porphyrine m-THPC est inversement proportionnelle à la taille des nanoparticules utilisées [274]. Les micelles et les liposomes, qui ont été les plus étudiés, présentent l'inconvénient d'être rapidement dégradés après avoir été injectés dans la circulation sanguine. Dans les études les plus récentes, ceux-ci sont remplacés par des nanoparticules inorganiques de taille inférieures à 100 nm [275]. Le PS peut être inséré de manière non covalente ou lié par couplage chimique. Comme la néoangiogenèse tumorale est très rapide, l'endothélium vasculaire tumoral est plus perméable que le normal, permettant aux nanoparticules de le traverser plus facilement. Ce phénomène, appelé effet EPR (Enhanced Permeability and Retention effect), se traduit par une accumulation passive des nanoparticules et une augmentation du ratio tissu tumoral/normal d'accumulation du PS [276].

Les nanoparticules, constituées d'atomes qui assurent une structure sphérique inférieure à 100 nm de diamètre, sont de plus en plus utilisées pour l'encapsulation et la délivrance des PS [277,278]. Les NPs peuvent être composées de polyesters tels que le PLGA (poly-DL-lactide-co-glycolide) ou de polymères inorganiques tels que les oxydes (comme les oxydes de fer), les métaux (comme l'or) et les céramiques (comme la Silice [279]) [275]. Du fait de l'acidité de l'environnement tumoral, des nanoparticules sensibles au pH acide sont

également proposées [280,281]. La petitesse de leur taille est un atout pour leur endocytose par les cellules tumorales, mais, bien que certaines nanoparticules présentent des caractéristiques physicochimiques très intéressantes [277,280,281], cette approche nécessitent généralement un moyen de ciblage actif [272,282].

Par conséquent, afin d'augmenter leur sélectivité vis-à-vis des cellules cancéreuses, les PS ou les particules peuvent être couplées à des molécules qui reconnaissent spécifiquement des marqueurs membranaires tumoraux [283,284].

### **I-3-4-2 Ciblage actif :**

Les molécules assurant un ciblage actif des PS vis-à-vis des tumeurs peuvent être des anticorps ou des ligands dont respectivement les épitopes ou les récepteurs sont surexprimés à la surface des cellules cibles. Un ciblage intracellulaire peut également intervenir dans le but de diriger le PS vers un compartiment subcellulaire précis et d'optimiser l'effet phototoxique.

#### *I-3-4-2-1 Structures moléculaires « simples » :*

Les PS peuvent être chimiquement couplés à des structures moléculaires de type glycane, polyamine ou folate qui permettent de discriminer entre les cellules saines et tumorales.

Par exemple, sachant que certains cancers surexpriment le récepteur à folate, des conjugués associant l'acide folique à la tétraphénylporphyrine ou à la chlorine ont été préparés et testés. Le couplage du PS à l'acide folique permet d'augmenter son niveau d'internalisation et d'accompagner son activité phototoxique [285]. De même, il est connu que les cellules tumorales surexpriment les transporteurs de glucose. Des études ont montré que des conjugués déoxyglucosamine-pyrophosphoribide 2 permettent de détruire sélectivement des tumeurs dans un modèle de gliome chez le rat [286].

#### *I-3-4-2-2 Anticorps monoclonaux :*

L'utilisation des anticorps monoclonaux (ou MAb pour monoclonal antibody) en PCT est appelée photoimmunothérapie (ou PIT) [284]. L'internalisation des MAbs dépend de leur taille et de l'antigène qu'ils reconnaissent. Les anticorps de pleine taille (150 KDa pour une IgG à 900 KDa pour une IgM) présentent des difficultés à pénétrer dans les cellules. Des

fragments d'anticorps ont ainsi été générés : F(ab')<sub>2</sub> (100 KDa), Fab (50 KDa) et scFv (25 KDa). Par exemple, une étude utilisant des conjugués MABs de pleine taille dirigés contre le récepteur à l'EGF (HER2) montre l'augmentation de la sélectivité mais une baisse de l'activité phototoxique par rapport au PS libre [287]. Par contre, le couplage du pyrophosphoribide-a à des scFv dirigés contre HER2 augmente l'activité phototoxique du PS *in vivo* [288].

Une étude récente a été consacrée à la production d'une protéine de fusion entre la protéine photosensibilisatrice KillerRed et un fragment scFv dirigé contre HER2 [289]. La protéine de fusion ainsi générée cible spécifiquement et détruit *in vitro* des cellules cancéreuses exprimant HER2.

La néoangiogenèse tumorale étant accompagnée de la surexpression de protéines telles que la fibronectine, des études ont été consacrées à son ciblage par des anticorps. Par exemple, des conjugués Chle6-MAB anti-fibronectine ont été évalués *in vivo*. En comparaison de conjugués réalisés à partir d'un MAB irrelevant, le conjugué Chle6-MAB cause un arrêt de la croissance tumorale dans un modèle murin [290].

#### *I-3-4-2-3 Ciblage médié par les systèmes ligands/récepteurs :*

Une méthodologie qui permet de dépasser certains inconvénients des MABs est le couplage des PS à des ligands spécifiques de récepteurs surexprimés par les cellules tumorales. Ces ligands étant de plus petite taille que les MABs sont plus rapidement endocytés par les cellules avec lesquelles ils interagissent. Quatre classes de ligands sont étudiées : (1) les protéines sériques (comme par exemple l'albumine, la transferrine et les lipoprotéines), (2) les peptides (ciblant l'EGF-R, la neuropiline, les intégrines ou encore la gastrine), et (3) certains inhibiteurs pharmacologiques dont les récepteurs sont surexprimés par les cellules tumorales [283]. Cette approche permet non seulement de cibler spécifiquement des cellules mais aussi de cibler des compartiments subcellulaires plus ou moins sensibles à l'action photodynamique.

Après injection *i.v.*, les PS libres s'associent à diverses familles de protéines sériques telles que l'albumine, la transferrine et les lipoprotéines. L'albumine a tendance à interagir avec des molécules hydrophiles, comme par exemple la phtalocyanine AlPcS<sub>4</sub>, alors que les lipoprotéines interagissent plutôt avec des PS hydrophobes, comme par exemple la ZnPhtalocyanine (ZnPc).



La protéine sérique la plus abondante est l'albumine. Cette protéine de 66 KDa participe au transport des acides gras du foie vers les tissus. Il est connu que l'altération physique de l'albumine la dirige vers les récepteurs scavenger exprimés par les macrophages. Or certains tissus tumoraux sont constitués jusqu'à 50% de macrophages. Pour éviter la dissémination du PS après injection, des conjugués covalents entre la BSA modifiée ou non et différents PS (AlPcS<sub>4</sub> et Chle6) ont été préparés. Les conjugués maléyl-BSA-AlPcS<sub>4</sub> montrent une meilleure affinité pour les récepteurs scavenger exprimés par la lignée cellulaire macrophagique J774 que les conjugués non maléylés, se traduisant par une meilleure pénétration cellulaire et une meilleure activité phototoxique *in vitro*. En revanche, la conjugaison covalente diminue l'activité phototoxique du PS [291]. Les conjugués mal-BSA-Chle6 ont été testés dans un modèle murin. Après injection intratumorale, contrairement au PS libre, l'accumulation des conjugués dans la tumeur est fonction de la proportion de macrophages intratumoraux [292].

Afin de se diviser, les cellules vivantes ont besoin d'un apport en ions métalliques. De ce fait, certaines cellules tumorales surexpriment le récepteur à la transferrine. Cette protéine de 76 KDa est le transporteur majeur d'ions de Fer à travers l'organisme. Ainsi, la transferrine (Tf) a été couplée à des liposomes (Lip) contenant la phthalocyanine AlPcS<sub>4</sub>. Les résultats montrent une augmentation de l'activité phototoxique des conjugués Tf-Lip-AlPcS<sub>4</sub> en comparaison du PS libre ou des conjugués Lip-AlPcS<sub>4</sub> sur la lignée cellulaire HeLa connue pour surexprimer le récepteur à la transferrine [293]. Après application intravésicale, contrairement aux conjugués Lip-AlPcS<sub>4</sub> ou au PS libre, les conjugués Tf-Lip-AlPcS<sub>4</sub> sont capables de cibler efficacement les cellules tumorales sur le modèle *in vivo* de cancer de la vessie chez le rat [294].

Les lipoprotéines permettent de solubiliser les lipides très hydrophobes, comme le cholestérol et les triglycérides, et de les transporter dans l'organisme. Les plus importantes sont les lipoprotéines de faible masse moléculaire (LDL). Lorsque l'apolipoprotéine est associée aux lipides, la LDL forme une particule globulaire dont la masse moyenne est de  $3.10^3$  KDa. Etant donné que les lipides sont nécessaires à la croissance et à la prolifération cellulaire, les cellules tumorales et leur vascularisation expriment fortement les récepteurs aux LDLs. Par conséquent, des conjugués covalents Chle6-LDL ont été préparés et comparés à la Chle6 libre ou associée de façon non covalente aux LDLs. Le couplage covalent permet d'assurer une internalisation spécifique et d'augmenter l'activité phototoxique de la Chle6 *in vitro* [295]. Plus récemment, des naphthalocyanines ont été incorporées dans le cœur de LDLs.

Leur accumulation préférentielle dans les tissus tumoraux exprimant le récepteur aux LDLs a été mise en évidence *in vivo* sur un modèle de tumeur sous-cutanée [296].

Du fait de leur métabolisme accéléré, de nombreuses tumeurs surexpriment les récepteurs aux facteurs de croissance. Il a été montré une augmentation de l'accumulation de la Chle6, sur la lignée cellulaire de cancer du sein MDA-MB-468 connue pour surexprimer le récepteur à l'EGF, lorsqu'elle est associée de façon covalente à l'EGF [297]. Cette accumulation de PS est corrélée à une phototoxicité accrue en comparaison du PS libre. De même, la neuropiline-1 (NRP-1), qui est également un co-récepteur du VEGF, est souvent surexprimée au niveau de l'endothélium vasculaire tumoral. Lorsque la chlorine TPC (5-(4-carboxylphenyl)-10,15,20-triphénylchlorine) est associée de façon covalente à l'heptapeptide ATWLPPR qui cible NRP-1, il a été montré que son endocytose est augmentée d'un facteur 25 et son activité phototoxique d'un facteur 10 [298]. *In vivo*, l'irradiation du conjugué produit une thrombose au niveau de la vascularisation tumorale qui induit une diminution significative de la croissance tumorale de gliomes humains U87 greffés chez des souris nude [299].

Plus récemment, des PS couplés à d'autres ligands ont été évalués *in vitro* et *in vivo*. Par exemple, le récepteur au facteur tissulaire fVII est surexprimé dans certaines leucémies et au niveau de l'angiogénèse tumorale. Par conséquent la conjugaison covalente de PS avec le Facteur Tissulaire a été testée. Les conjugués permettent d'augmenter l'efficacité phototoxique de la Verteporfine d'un facteur 4 vis-à-vis de cellules endothéliales exprimant le récepteur au fVII. *In vivo*, ces conjugués se comportent de manière similaire puisqu'ils augmentent significativement l'inhibition tumorale [300]. De même, un conjugué entre un inhibiteur du PSMA (antigène membranaire spécifique de la prostate qui est un marqueur du cancer de la prostate) et le pyrophéophorbide-a a été synthétisé et étudié *in vitro*. Cette approche permet d'induire de la phototoxicité spécifiquement sur les cellules exprimant le PSMA [244].

Enfin, de façon intéressante, certains travaux étudient le ciblage des compartiments intracellulaires. Par exemple, une autre approche a consisté à coupler un PS, associé à l'hémoglobine, avec l'EGF, une toxine à activité endosomolytique et une séquence NLS. L'EGF permet de cibler les récepteurs en surface des cellules. La toxine permet de relarguer les conjugués endocytés dans le cytoplasme et la séquence NLS permet d'acheminer le PS vers le noyau. L'hémoglobine étant utilisée comme module de transport du PS. Ces conjugués conservent leur activité phototoxique et ciblent le noyau de cellules exprimant le récepteur à l'EGF. Dans ce cas, le ciblage du noyau permet d'augmenter la toxicité du PS [301,302].

Dans certains cas, l'utilisation de la PDT est combinée à des inhibiteurs pharmacologiques des voies de signalisation de l'angiogénèse et/ou de l'inflammation, afin d'augmenter la sensibilité des tumeurs au choc photodynamique [303]. Par exemple, l'Erbix est un inhibiteur de l'angiogénèse qui cible l'EGF-R. La combinaison Erbitux+PDT dans un modèle murin de cancer de la vessie permet d'augmenter significativement l'effet antitumoral [304].

#### *I-3-4-2-4 Lectines :*

En raison de leur spécificité d'interaction avec divers glycanes et de leur potentiel d'endocytose, les lectines sont étudiées pour le ciblage de pathologies cellulaires associées à des modifications de la glycosylation. Dans le cadre de la PCT, il a été montré que ces protéines peuvent réaliser des interactions indépendantes de la reconnaissance glycanique avec des petites molécules de nature hydrophobique comme les porphyrines [305,306]. Des études de couplage entre lectine et PS ont été menées dans le but d'augmenter l'efficacité de la PCT. Cependant, la plupart des résultats présentent des études thermodynamiques d'association entre lectine et PS mais n'étudient pas la phototoxicité des complexes non covalents lectine-PS sur des cellules malignes [306,307,308,309]. Les lectines utilisées dans ces études sont la Jacaline [307,310,311], la Concanavaleine A [306], la PNA [306,308], et la lectine du pois PSA (*Pisum sativum* agglutinin) [309]. Des structures cristallographiques de complexes non covalents entre la Jacaline [311] ou la PNA [308] et la porphyrine H<sub>2</sub>TPPS ont été obtenus et caractérisés.

## II OBJECTIFS DU TRAVAIL

L'objectif du projet a été d'évaluer l'intérêt des lectines végétales en tant que vecteur de médicaments anticancéreux. Le modèle choisi est celui de la photochimiothérapie (ou PCT) anticancéreuse. Cette technique a l'avantage de présenter très peu d'effets secondaires comparativement aux protocoles de traitements anticancéreux classiques, comme la chimiothérapie et la radiothérapie.

La photochimiothérapie est basée sur l'action conjointe de la lumière et d'un photosensibilisant (PS) non toxique sans activation lumineuse. Deux approches de PCT sont actuellement utilisables en clinique : la thérapie photodynamique (PDT) et la photochimiothérapie extracorporelle (ECP). La PDT est appliquée à des tumeurs solides. Elle utilise des PS qui, après pénétration cellulaire, sont activés par irradiation lumineuse visible (entre 400 et 800 nm). En présence de l'oxygène cellulaire, l'activation du PS déclenche une production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) induisant un effet cytotoxique [188]. D'autre part, après cytophérèse, l'ECP consiste à incuber les leucocytes d'un patient avec un PS activable par les rayonnements UV-A (< 400 nm), induisant une fixation toxique du PS principalement au niveau de l'ADN cellulaire. Après traitement, les leucocytes sont ré-injectés au malade. Cette approche est utilisée comme traitement de la GVHD, de certaines maladies auto-immunes et de lymphomes cutanés, comme par exemple le lymphome T de Sézary.

En revanche, l'utilisation de la PCT en oncologie demeure limitée, en particulier à cause de la faible sélectivité des PS vis-à-vis des cellules cancéreuses. Les altérations de la glycosylation à la surface des tumeurs constituent des cibles potentielles pour la vectorisation de PS. Ainsi, certains épitopes *O*-glycaniques, comme les antigènes T ( $\text{Gal}\beta 1-3\text{GalNAc}\alpha 1-O\text{-Ser}$ ) et Tn ( $\text{GalNAc}\alpha 1-O\text{-Ser/Thr}$ ), résultent de défauts du métabolisme glycanique liés à la malignité cellulaire. Ils font partie des antigènes glycaniques associés aux tumeurs (TACAs) présents à la surface de nombreuses tumeurs solides ou liquides [47,50].

Les anticorps monoclonaux sont étudiés depuis de nombreuses années comme transporteurs potentiels de médicaments anticancéreux. Cependant, malgré leur grande spécificité de reconnaissance pour les antigènes associés aux tumeurs, aucun n'est utilisé en clinique comme vecteur de médicament. En effet, de nombreuses limites compliquent actuellement leur utilisation pour le ciblage de médicaments (coût, complexité de fabrication des conjugués médicament-anticorps, baisse de la spécificité de reconnaissance des

conjugués, instabilité des conjugués, limitation de la pénétration cellulaire,...). Les lectines végétales sont des protéines qui reconnaissent spécifiquement les glycanes. Certaines lectines possèdent d'étroites spécificités de reconnaissance qui en font des vecteurs potentiels pour le ciblage de médicaments vers des cellules présentant des altérations de la glycosylation [312]. Ainsi, à côté des anticorps, elles constituent une source potentielle de molécules vectrices. De plus, certaines lectines présentent des effets immunomodulateurs et/ou toxiques, induisant des effets anticancéreux directs (toxicité) [133,137] ou indirects (immuno-modulation) [138].

Morniga G (MorG) est une lectine végétale tétramérique isolée du mûrier noir (*Morus nigra*). Des expériences biochimiques ont montré qu'elle possède une spécificité de reconnaissance très élevée pour les clusters d'antigènes T et Tn [177]. De plus, lors de sa purification, une seconde lectine, Morniga M (MorM), a été isolée. Ces deux JRLs, dont les structures tridimensionnelles sont similaires, possèdent des spécificités de reconnaissance glycanique différentes. Alors que MorG est spécifique du galactose, MorM est spécifique du mannose [176]. Ainsi, MorG ciblerait préférentiellement la *O*-glycosylation alors que MorM ciblerait la *N*-glycosylation.

Ce projet vise (1) à caractériser, *in cellulo*, les effets biologiques des lectines du mûrier noir (immunomodulation et cytotoxicité), (2) à préparer et caractériser des conjugués PS-MorG. La caractérisation des conjugués concerne (1) l'étude de leur spécificité et de leur endocytose vis-à-vis de cellules tumorales, (2) l'évaluation de leur capacité à éliminer spécifiquement des cellules tumorales, dans des expériences de PCT en lumière visible *in vitro* et *in vivo* sur des modèles murins de tumeur solide (c'est-à-dire en PDT) ou liquide (c'est-à-dire en ECP), (3) à déterminer les mécanismes de la signalisation cytotoxique induite par les conjugués utilisés en PCT.



# **III RESULTATS EXPERIMENTAUX ET DISCUSSIONS:**





### **III-1 Effets immunomodulateurs et toxiques des lectines végétales du mûrier noir:**

Les lectines végétales sont connues depuis longtemps pour avoir des effets mitogénique et activateur des lymphocytes humains. Par exemple, la ConA a la capacité d'activer les lymphocytes T. De plus, certaines lectines, comme la ConA, peuvent avoir *in vitro* et *in vivo* des effets anticancéreux directs, en induisant la mort des cellules tumorales [136,137], ou indirects, en activant les défenses immunes anticancéreuses [138]. En revanche, les mécanismes, initiés par la reconnaissance des glycoconjugués membranaires par les lectines, sont encore en grande partie méconnus. Les bases moléculaires de l'activation des voies de signalisation en réponse aux lectines végétales sont très complexes en raison de la variation de la qualité de la glycosylation selon les phénotypes cellulaires et l'état physiologique des cellules. Par exemple, il a été montré que la qualité de la glycosylation est impliquée dans l'activation lymphocytaire [36]. De plus, malgré une structure tridimensionnelle similaire et une spécificité de reconnaissance monosaccharidique identique, certaines lectines végétales peuvent avoir des effets biologiques différents, suggérant qu'elles puissent interagir avec des glycoconjugués complexes différents [105,313].

Les lectines apparentées à la Jacaline (ou JRL) représentent un exemple intéressant de lectines phylogénétiquement et structuralement proches, mais dont les spécificités glycaniques sont potentiellement variées. Cette famille de lectines comprend des lectines dont les spécificités monosaccharidiques sont dirigées contre le galactose (g-JRL) ou le mannose (m-JRL). Cette divergence de spécificité monosaccharidique a été attribuée à leurs différences de séquences primaires et de biosynthèse [314]. Ainsi, le protomère des m-JRLs est constitué d'une seule chaîne polypeptidique alors que celui des g-JRLs est composé de deux chaînes associées de manière non covalente. De plus, une étude a montré une hypervariabilité des séquences et des structures au niveau des sites de reconnaissance glycanique des JRLs [169], qui n'est pas attendue au regard de la faible variabilité de reconnaissance monosaccharidique : c'est-à-dire mannose et galactose. Toutes ces différences biochimiques induisent des changements conformationnels au niveau des cavités de reconnaissance glycanique. Par conséquent, dans chacun des sous-groupes de JRLs (m-JRLs et g-JRLs), les spécificités oligosaccharidiques peuvent diverger en raison des différences dans l'accessibilité des sites de reconnaissance glycanique pour les glycanes complexes. Par exemple, lorsque la spécificité de reconnaissance polyglycanique de différentes m-JRLs est comparée, il apparaît que ces

lectines peuvent être sous-classées en fonction de leurs spécificités pour divers glycanes complexe [313]. Toutes ces études sont purement acellulaires. Il semble donc, à priori, intéressant d'étudier les effets biologiques comparés de certaines de ces lectines dans un contexte cellulaire.

Lors de l'extraction à partir de l'écorce de mûrier noir, deux lectines, Morniga M (MorM) et Morniga G (MorG), appartenant à la famille des JRLs ont été isolées. Alors que MorM est une mannose-JRL, MorG est une galactose-JRL. Dans un premier temps, nous avons comparé, sur des lymphocytes humains, les effets activateurs et cytotoxiques de MorM à ceux d'une autre m-JRL appelée Artocarpine (Arto) (article 1). Dans un second temps, nous avons étudié les effets immunomodulateurs et/ou toxiques de MorG, comparativement à ceux de MorM (article 2).

### ***III-1-1 Morniga M***

#### **III-1-1-1 Introduction de l'article 1:**

Morniga M et Artocarpine possèdent 70% d'identité de séquence et des structures moléculaires très similaires. En revanche, l'analyse bioinformatique des modèles tridimensionnels montre que Morniga M possède une cavité de reconnaissance glycanique plus large que son homologue Arto, lui permettant d'interagir certainement avec une plus grande variété d'oligosaccharides. Ainsi, ces deux lectines homologues dont les structures moléculaires sont très similaires et qui possèdent une spécificité monosaccharidique identique pourraient interagir avec des structures *N*-glycaniques complexes différentes et, ainsi, induire des effets biologiques distincts. De plus, en interagissant avec des molécules à la surface des cellules cibles et en permettant l'agrégation de ces molécules, différentes voies de signalisation qui conduisent à l'activation et/ou la mort cellulaire peuvent être activées en réponse aux lectines. Afin d'explorer cette hypothèse, les effets biologiques de ces deux lectines ont été étudiés et comparés sur des lymphocytes humains sains ou leucémiques.

**III-1-1-2 Article 1 : Two structurally identical mannose-specific jacalin-related lectins display different effects on human T lymphocyte activation and cell death**



## Two structurally identical mannose-specific jacalin-related lectins display different effects on human T lymphocyte activation and cell death

Hervé Benoist,<sup>\*,†,‡,1</sup> Raphaël Culerrier,<sup>§</sup> Guillaume Poiroux,<sup>\*,§</sup> Bruno Ségui,<sup>\*,†,‡</sup>  
Alain Jauneau,<sup>§</sup> Els J. M. Van Damme,<sup>||</sup> Willy J. Peumans,<sup>||</sup> Annick Barre,<sup>‡,§,2</sup> and  
Pierre Rougez<sup>‡,§,2</sup>

\*INSERM U.858 I2MR, Equipe 14, Toulouse, Cedex, France; <sup>†</sup>IFR31, Institut Louis Bugnard, CHU Rangueil, Toulouse, Cedex, France; <sup>‡</sup>Université Paul Sabatier (Toulouse III), Faculté des Sciences Pharmaceutiques, Services d'Immunologie et Biologie Cellulaire, Toulouse, France; <sup>§</sup>UMR UPS-CNRS 5546, Castanet-Tolosan, France; and <sup>||</sup>Department of Molecular Biotechnology, Laboratory of Biochemistry and Glycobiology, Ghent University, Ghent, Belgium

RECEIVED JULY 23, 2008; REVISED MARCH 10, 2009; ACCEPTED MARCH 18, 2009. DOI: 10.1189/jlb.0708434

### ABSTRACT

Plant lectins displaying similar single sugar-binding specificity and identical molecular structure might present various biological effects. To explore this possibility, the effects on human lymphocytes of two mannose-specific and structurally closely related lectins, Morniga M from *Morus nigra* and artocarpin from *Artocarpus integrifolia* were investigated. In silico analysis revealed that Morniga M presents a more largely open carbohydrate-binding cavity than artocarpin, probably allowing interactions with a broader spectrum of carbohydrate moieties. In vitro, Morniga M interacted strongly with the lymphocyte surface and was uptaken quickly by cells. Morniga M and artocarpin triggered the proliferation and activation of human T and NK lymphocytes. A minority of B lymphocytes was activated in artocarpin-treated culture, whereas Morniga M favored the emergence of CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. Moreover, cell death occurred in activated PBMC, activated T lymphocytes, and Jurkat T leukemia cells incubated with Morniga M only. The biological effects of both lectins were dependent on carbohydrate recognition. The Morniga M-induced cell death resulted, at least in part, from caspase-dependent apoptosis and FADD-dependent receptor-mediated cell death. Finally, Morniga M, but not artocarpin, triggered AICD of T lymphocytes. In conclusion, both lectins trigger lymphocyte activation, but only Morniga M induces cell death. In spite of similar in vitro mannose-binding specificities and virtually identical structure, only Morniga M probably interacts

with carbohydrate moieties bound to molecules able to induce cell death. The present data suggest that subtle alterations in N-glycans can distinguish activation and cell death molecules at the lymphocyte surface. *J. Leukoc. Biol.* **86**: 103–114; 2009.

### Introduction

After the discovery of the mitogenic activity of the *Phaseolus vulgaris* hemagglutinin on human lymphocytes by Nowell [1], plant lectins have become valuable tools to trigger the proliferation and activation of lymphocytes [2]. However, in spite of the overwhelming amount of experimental data about the proliferative activity of plant lectins, the molecular basis of this lectin recognition-dependent activation process is still poorly understood. At present, it is generally accepted that cross-linking of cell surface glycoproteins by lectins is the first step in a series of events that eventually results in activation and proliferation by triggering some signaling pathway(s) within the target cells [3–5]. Further deciphering of the molecular basis of the underlying pathways appears to be fairly complicated because of the extreme diversity of glycoconjugates exposed on the cell surface and the multitude of potential distinct signaling pathways. For example, the glycan chains attached to the membrane-associated glycoproteins (e.g., the CD phenotypic markers) vary considerably depending on the lymphocyte subsets (e.g., T cells, B cells, or NK cells) but also on the functional state of cells (growth, differentiation, activation/resting) [6, 7]. Similarly, plant lectins display pronounced differences regarding their ability to recognize and bind complex N-glycans present on the lymphocyte surface [8]. In this respect, it

Abbreviations: AICD=activation-induced cell death, APC=allophycocyanin, DP=double-positive, FADD=Fas-associated protein with death domain, FasL=Fas ligand, JRL=jacalin-related family, M-JRL=mannose-specific binding of JRL, Morniga M=mannose-specific *Morus nigra* agglutinin, PARP=poly (ADP-ribose) polymerase, PI=propidium iodide, zVAD=benzyloxycarbonyl Val-Ala-Asp-fluoromethylketone

1. Correspondence: INSERM U.858, Institut Louis Bugnard, CHU de Rangueil, BP 84225, 31432 Toulouse, Cedex 4, France. E-mail: herve.benoist@inserm.fr
2. These authors contributed equally to this work.

should be kept in mind that lectins with a similar (nominal) specificity toward simple sugars (such as mannose or galactose) often can interact with a different set of N-glycans [9, 10]. For instance, comparative studies of the mannose-specific legume lectins Con A and the *Lathyrus ochrus* lectin LoLI demonstrated that even structurally and evolutionarily closely related lectins with the same nominal specificity exhibit in vitro marked differences in reactivity toward various soluble complex N-glycans [10]. Evidently, these subtle differences in binding to complex glycans can explain why lectins with a similar overall structure elicit different activating and proliferating activities toward T and B lymphocyte subsets. The same applies to the cytotoxic effects of some lectins on various lymphocytes [11–14], which might be explained in terms of the activation of an apoptotic pathway upon binding of a lectin to a well-defined surface-exposed glycoconjugate.

Jacalin and other lectins found in the plant family Moraceae offer an interesting example of a set of structurally/evolutionarily closely related lectins with a strikingly broad spectrum of carbohydrate-binding specificities. The Jacalin-related family (JRL) comprises galactose-specific binding (G-JRL) [15–17] and mannose-specific binding (M-JRL) [18, 19] lectins. Although all M-JRL share the basic ability to bind mannose, they probably differ in capacity to react with oligosaccharides. Thus, two tandem repeat-type M-JRLs, designated as CCA and CRL, exhibit marked differences in specificity toward N-linked glycans in a frontal affinity chromatography analysis [20]. The putative functional consequences on lectin-treated cells of these fine sugar-binding discrepancies are unknown.

In the present work, two other lectins from the M-JRL subfamily, artocarpin [18] and Morniga M [19], which exhibit similar tertiary and quaternary structures, were used to examine their possible fine differential binding and functional effects on human lymphocytes. Our results indicate that lectins with the same nominal sugar specificity and three-dimensional structure, such as Morniga M and artocarpin, differently activate lymphocytes and importantly, display different cytotoxic effects. Thus, only Morniga M triggers AICD, involving caspase- and FADD-mediated signaling pathways. These results most probably rely on differences in oligosaccharide-binding specificities of apparently similar lectins, suggesting they can recognize subtle glycosylation modifications that distinguish cell death molecules from activation molecules at the leukocyte surface.

## MATERIALS AND METHODS

### Lectins, reagents, and antibodies

Con A was purchased from Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA). Morniga M was purified from black mulberry (*Morus nigra*) bark as described previously [17]. Artocarpin, the mannose-specific lectin from Jackfruit (*Artocarpus integrifolia*) seeds, was isolated by affinity chromatography on immobilized mannose [21]. Galactose, mannose, and  $\alpha$ -methyl mannose (Sigma-Aldrich, L'Isle d'Abeau Chesnes, France) were used to evaluate the glycosylation-dependent effects of lectins on lymphocytes. APC-conjugated anti-CD19 mAb was purchased from Dako (Glostrup, Denmark). APC-conjugated anti-CD56, PE-conjugated anti-CD71, and FITC-conjugated anti-CD25 mAb were from PharMingen (San Diego, CA, USA). Different fluoro-

chrome-labeled anti-CD3, anti-CD14, anti-CD4, anti-CD8, and anti-CTLA4 mAb were from Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ, USA).

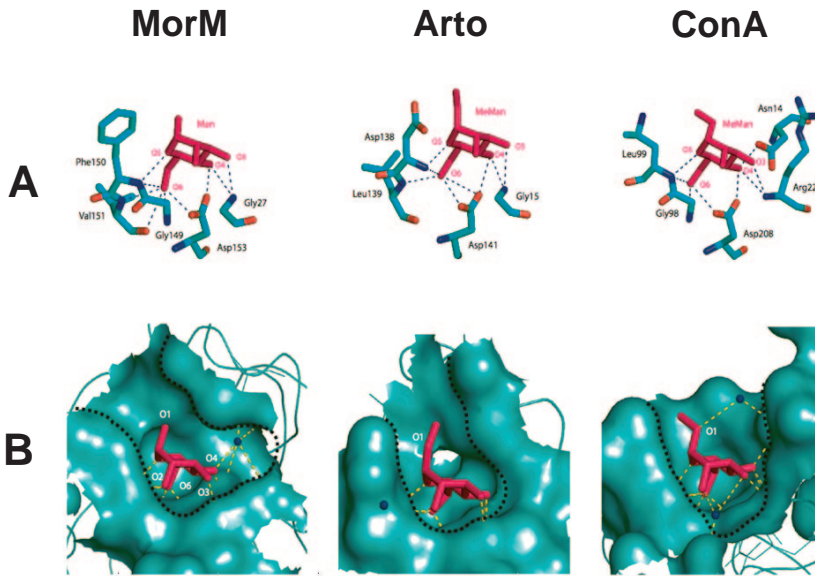
Lectins (1 mg/mL in 50 mM borate buffer, pH 8.5) were labeled with FITC (Acros Organics, Halluin, France) using the EZ-label FITC kit protocol (Pierce, Rockford, IL, USA). Free FITC was removed by extensive dialysis against 100 mM PBS (pH 7.2) in the dark. The FITC-lectin concentration was estimated by the bicinchoninic acid method (BCA Protein Assay kit, Pierce). Fluorescence measurements (at 485 nm) of 5  $\mu$ g/mL solutions yielded a similar value of  $80 \pm 5$  fluorescence units for both FITC-labeled lectins.

### Human peripheral blood cell culture and proliferation and activation assays

PBMC were isolated from healthy donors by Ficoll-Paque Plus (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) density gradient centrifugation at 2000 rpm for 20 min. Peripheral T lymphocytes were isolated using the RosetteSep human T cell enrichment cocktail (StemCell Technologies, Grenoble, France) + Ficoll-Paque Plus, allowing more than 97% of T cell purity. The cells ( $10^6$  cells/mL) were cultured in triplicate in U-bottom 96-well plates (100  $\mu$ L/well) or in 24-well plates (1 mL/well) in RPMI 1640 supplemented with 10% FCS (Gibco, Cergy-Pontoise, France). For proliferation assays, Morniga M, artocarpin, and Con A were added at different concentrations ranging from 0.312 to 20  $\mu$ g/mL, and then the cells were incubated for 48 h or 72 h at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> humidified atmosphere, and [<sup>3</sup>H]thymidine (5  $\mu$ Ci/well; ICN, Orsay, France) was added for the final 16 h of incubation. In some experiments, PBMC or isolated T lymphocytes were incubated for 3 h or 6 h with different concentrations of lectins, washed in the presence of methyl  $\alpha$ -D-mannopyranoside, and incubated further for 48 h or 72 h. In experiments using isolated T lymphocytes, submitogenic (i.e., fold increase between 1 and 1.5 as compared with control) concentrations of anti-CD28 mAb (1  $\mu$ g/mL; clone L283, Becton Dickinson) or PMA [0.3 ng/mL (Sigma-Aldrich)] were added with lectins. The content of the plates was harvested onto a glass fiber filter using a 96-well automatic cell harvester (Harvester 96 Tomtec, Wallac-EG&G Instruments, Evry, France), and the [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation was measured by liquid scintillation counting (Wallac, PerkinElmer, Wellsley, MA, USA). Proliferation indexes of triplicates were calculated from the ratio mean counts/min (cpm) of experimental assay/negative control. For flow cytometric analysis of the lymphocyte activation, lectins were added at concentrations yielding maximal proliferation, and the cells were analyzed after 24–72 h incubation, as indicated. These concentrations were 5  $\mu$ g/mL (0.075  $\mu$ M) for Morniga M, 10  $\mu$ g/mL (0.1  $\mu$ M) for Con A, and 20  $\mu$ g/mL (0.3  $\mu$ M) for artocarpin. Cells cultured with and without Con A were used as positive and negative controls, respectively.

### Flow cytometry (FACS) analysis

Naive or lectin-activated lymphocytes were washed with PBS (pH 7.4) and pelleted by centrifugation at 1400 rpm for 5 min and then stained at 4°C. Lectin binding on inactivated T, B, and NK lymphocytes was analyzed using FITC-labeled lectin + APC-conjugated anti-CD3, anti-CD19, or anti-CD56 mAb. In PBMC cultures, specific activation of lymphocyte subsets (T cells, B cells, and NK cells) was checked after 72 h culture (as described above) by adding a mixture of three labeled antibodies (PerCP anti-CD3/PE anti-CD71/FITC anti-CD25; APC anti-CD19/PE, anti-CD71/FITC, anti-CD25; or APC anti-CD56/FITC anti-CD25/PE anti-CD71). Triple labeling of putative regulator T cells was also checked using a mixture of labeled anti-CD3/anti-CD4/anti-CD8 mAb and anti-CD3/anti-CTLA4/anti-CD25 mAb. After incubation for 30 min in the dark, cells were washed in PBS (pH 7.4), centrifuged at 1400 rpm for 5 min, and resuspended in 300  $\mu$ L PBS (pH 7.4) containing 1% (w/v) of paraformaldehyde. Double and triple CD receptor expression was monitored by a FACScan flow cytometer (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) in a gate corresponding to lymphocytes, as defined by the size and granularity parameters and after exclusion of CD14-positive cells (monocytes).



**Figure 1. Comparison of the monosaccharide-binding site of Morniga M, artocarpin, and Con A.** (A) Hydrogen bonds forming the network connecting mannose (Man) or  $\beta$ -methyl-mannopyranoside [methyl-mannose (MeMan)] to the binding site of Morniga M (MorM), artocarpin (Arto), and Con A are indicated by dotted lines. (B) In silico surface analysis showing the size and shape (black dotted lines) of the carbohydrate-binding site of Morniga M, artocarpin, and Con A. Hydrogen bonds are represented by yellow dotted lines, and blue spheres correspond to water molecules. All cartoons were generated using PyMol [W. L. DeLano (<http://www.pymol.org>)].

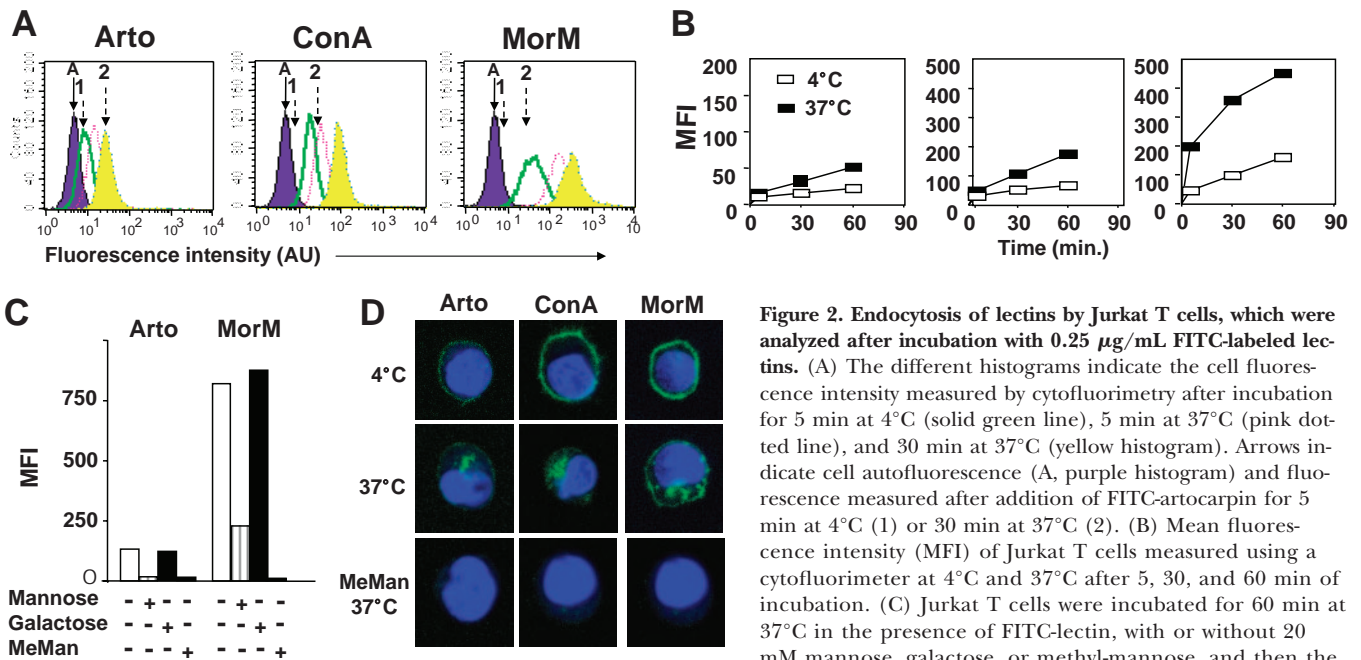
**Analysis of lectin binding to and uptake by cells**

Jurkat T cells ( $10^6$ /mL) were incubated with FITC-lectin (0.25  $\mu$ g/mL) for 5–60 min at 4°C or 37°C. After washing at 4°C, cells were analyzed by FACS or by confocal microscopy. Confocal images of Jurkat T cells showing the endocytosis of FITC-labeled lectins were acquired in a sequential mode with a laser-scanning system equipped with an upright microscope (CLSM-SP2, Leica, Mannheim, Germany) and a 40 $\times$  (numerical aperture 1.25) oil immersion objective. The 405-nm ray line of a diode laser was used for excitation, and the emitted light was collected in the range of 410–470 nm, corresponding to the 4',6-diamidino-2-phenylindole emission range. A 488-nm ray line of an argon laser was used for the FITC detection, and the emitted light was collected in the range of 500–550 nm.

**Lectin-mediated cytotoxicity assay**

Lectin-induced cell death was estimated by the MTT reduction method and flow cytometry analysis, as described previously [22]. Cell viability was analyzed after 1–3 days culture of PBMC, isolated T lymphocytes, or Jurkat leukemia T cells. In some experiments, FADD- or caspase-8- and -10-deficient Jurkat T cells [22] were used. In some experiments zVAD (40  $\mu$ M) was added to culture to inhibit caspases.

To trigger AICD, the cytotoxic effect of lectins was examined after activation of PBMC by Morniga M (20  $\mu$ g/mL) or by anti-CD3 mAb (OKT3: 1/50, supernatant of hybridoma obtained from American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA; CRL-8001) and activation of isolated T lymphocytes by OKT3 mAb (10 ng/mL; Orthoclone, Janssen-Cilag, Issy-les-



**Figure 2. Endocytosis of lectins by Jurkat T cells, which were analyzed after incubation with 0.25  $\mu$ g/mL FITC-labeled lectins.** (A) The different histograms indicate the cell fluorescence intensity measured by cytofluorimetry after incubation for 5 min at 4°C (solid green line), 5 min at 37°C (pink dotted line), and 30 min at 37°C (yellow histogram). Arrows indicate cell autofluorescence (A, purple histogram) and fluorescence measured after addition of FITC-artocarpin for 5 min at 4°C (1) or 30 min at 37°C (2). (B) Mean fluorescence intensity (MFI) of Jurkat T cells measured using a cytofluorimeter at 4°C and 37°C after 5, 30, and 60 min of incubation. (C) Jurkat T cells were incubated for 60 min at 37°C in the presence of FITC-lectin, with or without 20 mM mannose, galactose, or methyl-mannose, and then the fluorescence was quantified as in B. Data are representative of two independent experiments. Comparable results were obtained at 4°C. (D) Confocal microscopy of Jurkat T cells showing endocytosis of FITC-labeled lectins after 30 min of incubation at 4°C or at 37°C, with or without methyl-mannose at 37°C.

fluorescence was quantified as in B. Data are representative of two independent experiments. Comparable results were obtained at 4°C. (D) Confocal microscopy of Jurkat T cells showing endocytosis of FITC-labeled lectins after 30 min of incubation at 4°C or at 37°C, with or without methyl-mannose at 37°C.



Moulineaux, France) + IL-2 (100 UI/mL) + anti-CD28 mAb (1  $\mu$ g/mL). T lymphocyte activation was checked using anti-CD3 and anti-CD25 mAb labeling. Activated CD3 T lymphocytes were obtained after 3-day culture. After washing, the activated cells were incubated with different lectins for 24 h or 48 h, and cell viability was evaluated using MTT assay or by flow cytometry after PI and FITC-Annexin V staining. Morniga M-activated lymphocytes were obtained by 3 h incubation with the lectin, washed with medium containing methyl  $\alpha$ -D-mannopyranoside, and cultured for 2 days. Then, Morniga M-activated lymphocytes were cultured for 24 h with the different lectin (20  $\mu$ g/mL). Cell viability was determined by cytometry analysis.

For cytometry analysis, the percentage of viable cells was determined using the size and granularity parameters, i.e., in gates R1 and R2, defined as containing apparently viable lymphocytes (corresponding to a normal morphology of PBL or of Jurkat T cells) or nonviable (altered morphology), respectively. To allow study of phosphatidylserine externalization, cells were labeled with Annexin V-FITC and PI for 10 min at 4°C (Annexin V/FITC kit, AbCys S.A., Paris, France), and then the percentages of apoptotic cells (Annexin+/PI- cells) and necrotic cells (Annexin+/PI+ cells) were determined in R1 or in R1 + R2 gates (in R2, 100% of cells are stained by PI and/or Annexin V).

**Western blot analysis**

Western blots were performed as described elsewhere [22]. Briefly, Jurkat T cells were cultured for 24 h or 48 h, with or without lectin, and were treated for total protein extraction. Then, 80  $\mu$ g was separated on SDS-PAGE gel, transferred onto nitrocellulose membranes, and analyzed using anti-human PARP polyclonal antibodies (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) or anti- $\beta$ -actin mAb (Sigma-Aldrich). Positive control was total proteins extracted from mouse FasL-treated Jurkat T lymphocytes.

Mouse FasL was produced by Neuro-2A cells stably transfected with a plasmid encoding FasL.

**Statistical analysis**

Results are expressed as the means  $\pm$  sd of data obtained from four to 12 donors. Statistical significance was determined by means of Student's *t*-test. *P* < 0.05 was considered significant.

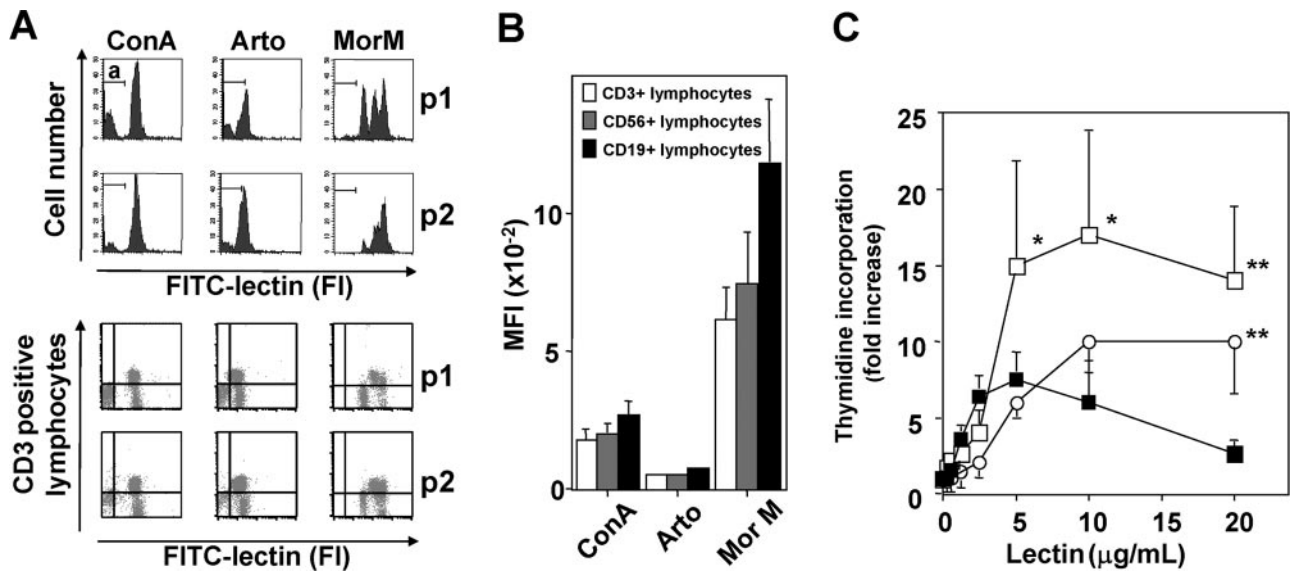
**In silico structural analysis**

The three-dimensional structures (deposited in the Brookhaven Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank) of Morniga M (1XXR) [19], artocarpin (1J4U) [18], and Con A (5CNA) [23], complexed to mannose (Morniga M) or  $\beta$ -methyl-mannopyranoside (artocarpin, Con A), were displayed and analyzed with PyMol [Warren L. DeLano (<http://www.pymol.org>)]. The atomic coordinates of oligosaccharides with a trimannoside core were taken from the Sweet II database of the GlycoScience.de website (<http://www.glycosciences.de/modeling/glyprot/php/main.php>).

**RESULTS**

**Morniga M and artocarpin differ in binding to human lymphocytes**

All three lectins included in our experiments possess similar carbohydrate-binding sites, which interact predominantly with O3, O4, O5, and O6 of mannose through a quasi-identical network of hydrogen bonds (Fig. 1A). In this respect, an ex-



**Figure 3. Morniga M and artocarpin interact with healthy human lymphocytes and trigger their proliferation.** (A and B) Human PBMC were incubated for 30 min at 4°C with FITC-labeled lectins used at 0.25  $\mu$ g/mL and with different fluorochrome-labeled mAb (anti-CD3, anti-CD19, anti-CD56, or anti-CD14). (A) The flow cytometry analysis was performed in a gate corresponding to lymphocytes, as defined by the size and granularity parameters [after exclusion of CD14-positive cells (monocytes)]. (Upper) Fluorescence intensity (FI) of lymphocytes from two healthy donors (p1, p2) incubated with FITC-labeled lectins. a, Autofluorescence. (Lower) Fluorescence intensity of T (CD3+) lymphocytes labeled with FITC lectins. Representative results of three identical experiments. (B) Mean fluorescence intensity from lectin-positive T (CD3+), NK (CD56+CD3-), or B (CD19+CD3-) cells. Mean values  $\pm$  sd from seven healthy donors. (C) Proliferative index calculated for PBMC cultured for 3 days in the presence of increasing concentrations of Morniga M (■), artocarpin (○), and Con A (□). Values are means  $\pm$  sd of five experiments using a total of six to 12 different healthy donors. \*, As compared with artocarpin- or Morniga M-treated cells; \*\*, as compared with Morniga M-treated cells; *P* < 0.05.



tremely conserved Asp residue (Asp153 of Morniga M, Asp141 of artocarpin, Asp208 of Con A) interacting with O6 and O4 of mannose plays a key role in the docking of the sugar to the carbohydrate-binding site [19]. An *in silico* surface analysis of the carbohydrate-binding cavity of the lectins clearly indicates that the binding site of Morniga M is more extended and open than those of artocarpin and Con A (Fig. 1B). Artocarpin and Con A exhibit a rather similarly sized and shaped carbohydrate-binding cavity, suggesting that these two lectins accommodate the same or structurally similar high-mannose and complex N-glycan chains. As a result, Morniga M could accommodate more bulky oligosaccharide chains than the other two lectins, which would increase the range of target glycoconjugates.

To examine this possibility, the interaction of lectins with lymphocytes was studied using Jurkat T cells and PBMC. Cytometric analysis (Fig. 2, A and B) and confocal microscopy (Fig. 2C) of Jurkat T cells, treated previously with FITC-labeled lectins, showed that Morniga M differs from artocarpin in displaying a strong interaction at 4°C with the cell membrane and a rapid and strong endocytosis (Fig. 2, B and C) within 5 min incubation at 37°C (Fig. 2B). In addition, as expected, the interaction of lectins with lymphocytes was inhibited by methyl-mannose and mannose but not by galactose (Fig. 2C), confirming the sugar specificity of lectin interaction with lymphoid T cells.

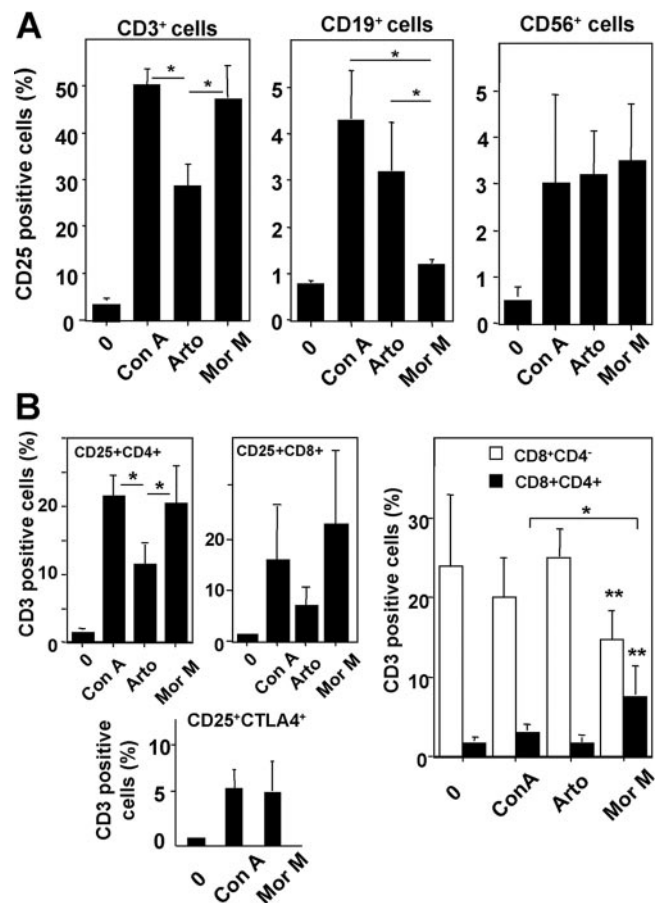
FACS experiments performed at 4°C with FITC-labeled lectins (0.25 µg/mL) showed that Morniga M interacted strongly with the entire lymphocyte population of PBMC, whereas artocarpin and Con A reacted with some lymphocyte subpopulations only (Fig. 3A, upper). Depending on the donor, up to 30% of lymphocytes remained unlabeled, indeed, after addition of FITC-artocarpin and FITC-Con A to PBMC. Phenotypic analysis of FITC-lectin-labeled lymphocytes revealed that the three lectins interact with the T (CD3+) lymphocyte population (Fig. 3A, lower) and with NK (CD56+ CD3-) cell and B (CD19+CD3-) lymphocytes (not shown). It is also worth mentioning that FITC-Morniga M yielded much higher mean fluorescence intensity than FITC-artocarpin and FITC-Con A in the measurements with the lymphocytes (Fig. 3B). Taken together, the cytofluorimetric analyses indicate that Morniga M has a broader spectrum of molecular targets at the cell surface of the lymphocytes than artocarpin and Con A.

### Morniga M preferentially activates T lymphocytes

As the putative interactions with the lymphocyte surface appear stronger with Morniga M than with artocarpin, the *in vitro* biological effect on lymphocytes was compared. Morniga M induced the proliferation of 3-day-old-cultured PBMC in a concentration range between 0.312 and 20 µg/mL, with a maximum effect at 5 µg/mL, whereas artocarpin required higher concentration ( $\geq 10$  µg/mL) to provoke its maximal proliferative effect (Fig. 3C). Both lectins, however, act differently from Con A, which displayed a higher proliferative index value in the 5- to 10-µg/mL range of concentration (Fig. 3C). At 20 µg/mL, Morniga M drastically decreased the incorporation of [<sup>3</sup>H]thymidine by PBMC, whereas Con A had

only a limited inhibitory effect, and artocarpin had no inhibitory effect at all (Fig. 3C).

To identify the lymphocyte subsets that are preferentially activated, the expression of CD25 was checked in 3-day-old-cultured T, B, and NK cell populations after treatment with the lectins at a dose that yields maximal lymphocyte proliferation. As could be expected, the percentage of CD25+ T (CD3+) lymphocytes increased in response to all three lectins but to a different extent (Fig. 4A). Morniga M and Con A equally enhanced the percentage of T lymphocytes expressing CD25 (i.e., CD3+ CD25+), whereas this percentage was statistically lower in artocarpin-treated cells. The percentage of B cells expressing CD25 (i.e., CD19+ CD25+ cells) was similarly increased upon artocarpin and Con A treatment but remained unchanged in Morniga M-treated cells (Fig. 4A). Finally, no significant difference was observed in the enhanced percent-



**Figure 4. Activation of lymphocyte populations by Morniga M and artocarpin.** Human PBMC were cultured for 3 days in the presence of the indicated lectin at concentrations triggering maximal cell proliferation. Cell analysis was performed by flow cytometry. (A) Expression of CD25 in CD3+ T lymphocytes, CD19 (CD3-) B lymphocytes, and CD56+ (CD3-) NK cells. \*,  $P < 0.05$ . (B) Expression of CD25/CD4, CD25/CD8, CD8/CD4, and CD25/CTLA4 in CD3+ cells after labeling with the corresponding mAb. Values are means  $\pm$  SD of at least three experiments performed with six to nine different healthy donors. \*, and \*\*, As compared with control cells;  $P < 0.05$ .

age of activated NK lymphocytes (i.e., CD56+ CD25+) between the lectin-treated PBMC samples (Fig. 4A). Similar results were observed using CD71 as another activation marker of lymphocytes (results not shown). According to these data, Morniga M activates T lymphocytes and NK cells but seems to be devoid of any activity, after 3-day culture, toward B lymphocytes. In this respect, Morniga M differs from other mannose-specific lectins, which besides T lymphocytes and NK cells, also activate some B lymphocytes.

## Morniga M allows the emergence of CD4+ CD8+ DP T lymphocytes in PBMC cultures

To examine the possibility that Morniga M might differ from other lectins at the level of the induced activation in the numerous subpopulations of T lymphocytes, the expression of CD25 was evaluated in CD4+ and CD8+ T lymphocytes, using PBMC cultured for 3 days in the presence of the lectins at concentrations inducing maximal cell proliferation. No significant difference was observed in the percentage of CD25+ CD4+ CD3+ lymphocytes and of CD25+ CD8+ CD3+ lymphocytes between Morniga M- and Con A-treated PBMC (Fig. 4B). The artocarpin-treated cells exhibited a lower percentage of activated CD25+ CD4+ T lymphocytes, which confirms the weaker activating effect of this lectin on T cells. To explain the observed decrease in mitogenic activity of Morniga M toward PBMC at supraoptimal concentrations (i.e., >5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; Fig. 3C), it could be hypothesized that the lectin may increase the

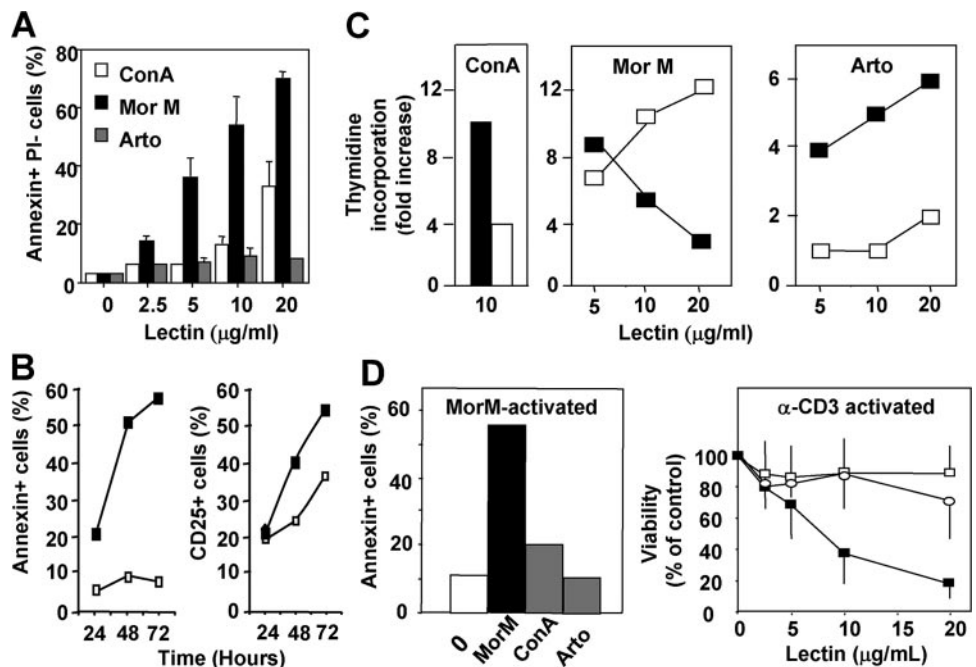
expression of CTLA4, known to transmit an inhibitory signal to activated T cell and to be expressed on a subset of CD25+ T regulatory cells suspected to inhibit the proliferation of T lymphocytes [24]. To check this hypothesis, the expression of CTLA4 was investigated in PBMC cultured for 3 days. No significant difference could be detected in the percentage of CD25+ CTLA4+ CD3+ lymphocytes between the Morniga M- and Con A-treated cells (Fig. 4B). This finding suggests that the CTLA4 expression and/or the growth of CD25+ CTLA4+ T lymphocytes, known to contain regulatory cells with suppressive properties on activated lymphocytes [24], were not facilitated by Morniga M as compared with Con A. Finally, the main difference observed between the mannose-specific lectins concerns the significant increase upon treatment with Morniga M of DP T cells accompanied by a decrease of CD8+ CD4- cells in the CD3+ T lymphocyte population (Fig. 4B). Taken together, these results suggest that notwithstanding their documented structural near-identity and similar sugar-binding specificity, Morniga M and artocarpin induce different activation mechanisms in a heterogeneous population such as human peripheral blood lymphocytes.

## Morniga M induces activated T lymphocyte cell death

To get an insight into the cytotoxic activity of Morniga M toward lymphocytes as a possible mechanism for the inhibition of lymphocyte proliferation at supraoptimal concentrations (>5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), the lymphocyte cell death was investigated in

**Figure 5. Morniga M induces AICD in peripheral blood T lymphocytes.**

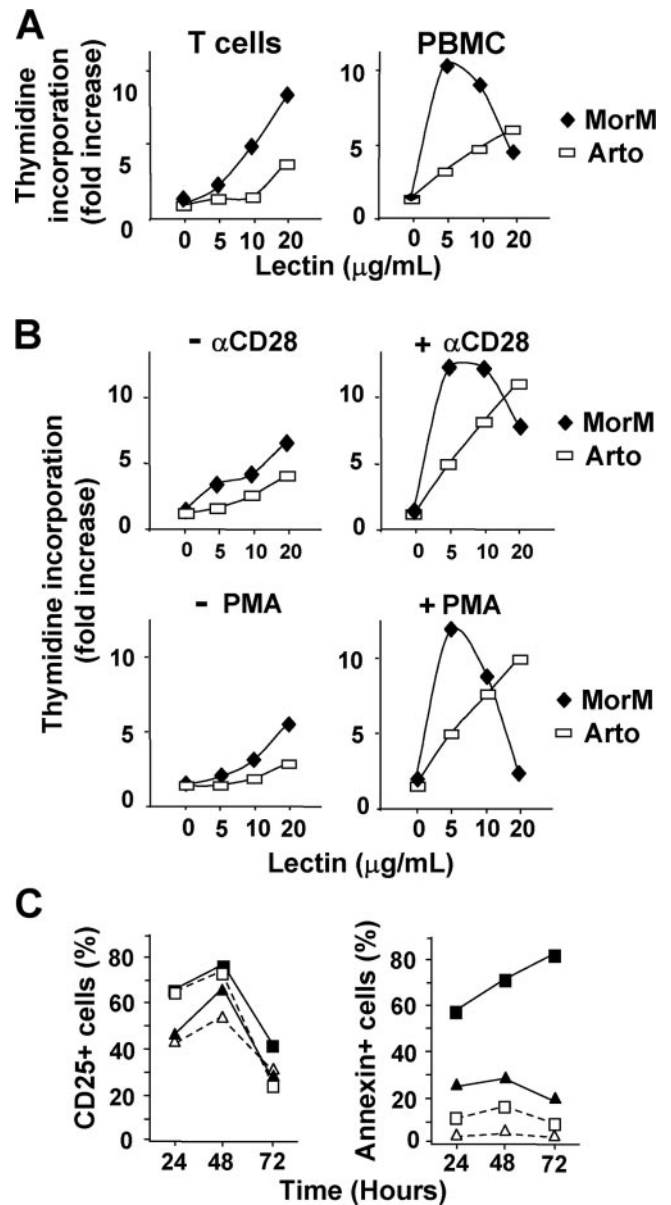
(A) Cytofluorimetric analysis of PBMC from different donors ( $n=5$ , two independent experiments) cultured for 3 days in the presence of lectins at different concentrations after staining with PI and FITC-Annexin V. The analysis was performed in the gate defined as containing apparently viable lymphocytes, according to the size and granularity parameters. Percentages of apoptotic (Annexin+ PI-) lymphocytes: Values are means  $\pm$  SD of five donors. Concentrations <2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  did not induce cell death significantly. (B) Cytofluorimetric analysis of PBMC cultured for 1–3 days in the presence of 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Morniga M (■) or artocarpin (□). Annexin-positive cells and CD25-positive cells were analyzed among CD3+ lymphocytes. Data are representative of two independent experiments (mean of two donors). (C) PBMC were incubated for 3 h with increasing concentrations of lectin, washed (□) or not (■), and then cultured further for 3 days. Proliferative indexes were calculated by monitoring [ $^3\text{H}$ ]thymidine incorporation. Data are means of values obtained with PBMC from two healthy donors and are representative of two independent experiments. (D, left) PBMC were cultured for 3 h with Morniga M (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , Morniga M-activated), washed, and cultured for 48 h in control medium. Then, 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of the indicated lectin was added for 24 h. Values are means of cytometric analysis of PBMC from two healthy donors and are representative of two independent experiments. (Right) PBMC were cultured for 3 days with anti-CD3 mAb (1/50,  $\alpha$ -CD3-activated), washed, and then incubated for 48 h with the indicated lectin at various concentrations [Morniga M (■), artocarpin (□), Con A (○)]. Cell viability was evaluated using the MTT assay. Values are means  $\pm$  SD of four independent experiments performed with PBMC from seven different healthy donors.



the presence of increasing concentrations of Morniga M. Apoptotic lymphocytes, defined as Annexin-positive and PI-negative cells (Fig. 5A), could be detected. The percentage of these cells increased in a concentration- and time-dependent manner (Fig. 5, A and B). In addition, increase of cell death was correlated with the activation level in CD3<sup>+</sup> lymphocytes, as evaluated by CD25 expression (Fig. 5B). In contrast to Morniga M, artocarpin induced no cell death under the same experimental conditions (Fig. 5, A and B). It is also noteworthy that Con A, which is a cytotoxic lectin toward T lymphocyte cells [11, 12], exhibited a lower cytotoxic effect than Morniga M (Fig. 5A).

As observed above, Morniga M addition to culture medium triggered concentration-dependent proliferation and cell death after a 3-day incubation, whereas artocarpin addition only induced proliferation. To discriminate between the activating and toxic effects of Morniga M, PBMCs were incubated for 3 h with Con A, artocarpin, or Morniga M, washed to remove the free lectin from the culture medium, and then, proliferation was estimated 3 days later. Removal of the lectin after 3 h incubation resulted in much less lymphocyte proliferation for artocarpin or Con A treatment (Fig. 5C), as compared with the proliferation of lymphocytes incubated for 3 days with the lectin. On the contrary, the absence of Morniga M after 3 h of culture allowed a dose-dependent increase of lymphocyte proliferation, suggesting that this lectin triggers toxicity only after 3 h of culture and following lymphocyte activation (Fig. 5C). This result suggests that Morniga M might trigger AICD, known to be a control mechanism of life and death of activated lymphocytes. To explore this possibility, lectin-induced cell death was studied after PBMC activation by Morniga M or anti-CD3. In both activation conditions, Morniga M clearly induced a stronger cell death of activated T lymphocytes than Con A, whereas artocarpin was devoid of toxic effects (Fig. 5D).

As lectin effects on lymphocyte proliferation, activation, and cell death were analyzed above in complex conditions using PBMC, experiments were performed with isolated peripheral T lymphocytes from healthy human donors. Under these experimental conditions, the two lectins showed a decrease of mitogenic activity as compared with PBMC. Indeed, 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Morniga M was necessary to promote similar proliferation in isolated T lymphocytes to 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in PBMC (Fig. 6A). In addition, no inhibition of proliferation was observed in T lymphocytes, only when costimulatory signals, such as anti-CD28 antibody or PMA, were added to culture (Fig. 6B), suggesting that lectin-activated non-T cells provide additional signals to T lymphocytes in lectin-activated PBMC (Fig. 6A). Of note, similar data were obtained when T cells were activated by a submitogenic concentration of anti-CD3 antibody (not shown). These costimulatory signals seem indispensable to allow the expression of the Morniga M inhibitory effect. When optimal proliferation conditions were applied on isolated T lymphocytes, FACS analysis indicated that both lectins triggered a strong CD25 expression on the T cell surface, already at 24 h and maximum at 48 h (Fig. 6C, left). In addition, cell



**Figure 6.** Effects of lectins on isolated human T lymphocytes. (A) Peripheral blood T lymphocytes or PBMC from the same donors were incubated for 3 days with the indicated concentration of lectins. (B) Peripheral T lymphocytes were incubated with lectins, with (+) or without (-) addition of submitogenic concentrations of anti-CD28 mAb (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) or PMA (0.3 ng/mL). (A and B) Results are means of proliferative indexes calculated by monitoring [ $^3\text{H}$ ]thymidine incorporation and using two donors. Data are representative of two independent experiments. (C) Peripheral blood T lymphocytes were incubated in the presence of PMA (0.3 ng/mL) + Morniga M [5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (▲) or 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (■)] or artocarpin [5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (△) or 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (□)]. Expression of CD25 and Annexin-positive cells was analyzed by cytofluorimetry in a gate defined as containing apparently viable lymphocytes according to the size and granularity parameters. Results are means of two donors and representative of two independent experiments.



death (Annexin-positive cells) increased strongly in a time-dependent manner, only when cells were incubated in the presence of 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Morniga M (Fig. 6C, right). Finally, only the addition of methyl-mannose, but not galactose, inhibited Morniga M- and artocarpin-mediated proliferation and activation of T lymphocytes (Fig. 7A) and Morniga M-induced cell death of activated T lymphocytes (Fig. 7B), indicating that the lectin effects are dependent, at least partly, on sugar recognition.

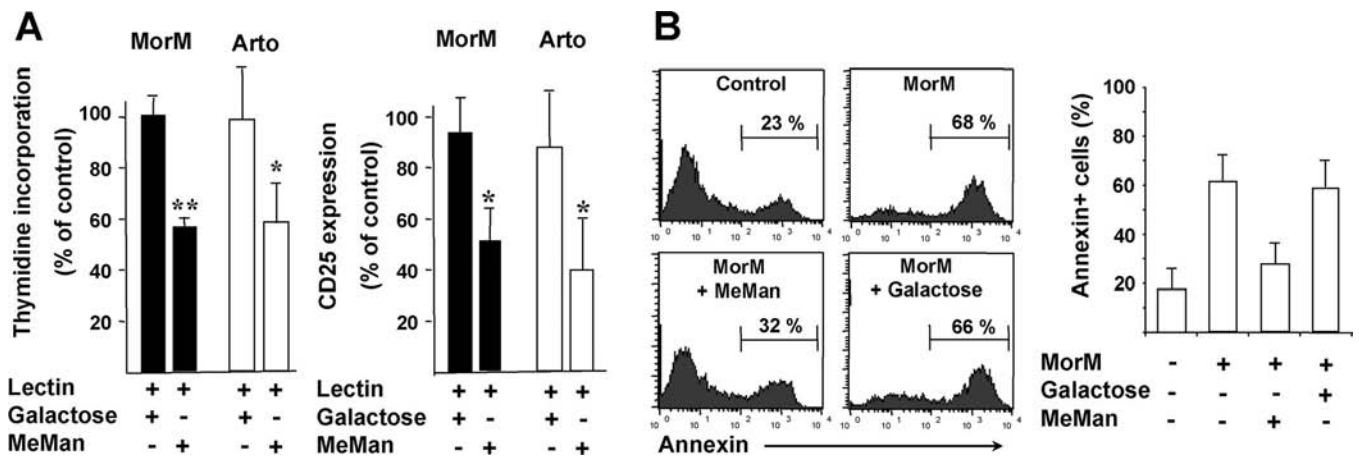
To investigate the Morniga M-induced cell death mechanism, FACS experiments were performed on the Jurkat T cell line cultured in the presence of increasing concentrations of lectins. Lymphocyte cell death was detectable as early as 24 h of culture in the presence of Morniga M (result not shown), whereas no or little cell death was induced by artocarpin or Con A after 48 h culture (Fig. 8A). As observed previously with peripheral blood cells (Fig. 5, A and B) and isolated T lymphocytes (Figs. 6C and 7B), the Morniga M-induced death of Jurkat T cells most probably relies, at least partly, on an apoptotic mechanism, as can be concluded from the accumulated apoptotic cells (Annexin-positive and PI-negative lymphocytes) in the R1 gate (Fig. 8B). In addition, cleavage of PARP (a nuclear-target of effector caspases) could be detected (Fig. 8C), suggesting that Morniga M induces a caspase-dependent mechanism of cell death in proliferating T cells. To investigate the role of caspases, experiments were performed using zVAD (a broad-spectrum caspase inhibitor). In addition, experiments were conducted in caspase-8 and -10 doubly deficient Jurkat T cells, as well as in FADD-deficient Jurkat T cells, to investigate the putative involvement of death

receptors from the TNFR superfamily. Under our experimental conditions, Morniga M-induced cell death was decreased significantly when caspases were inhibited or when Jurkat T cells were deficient in caspase-8 and -10 or FADD (Fig. 8C), indicating that the lectin could activate FADD- and caspase-dependent signaling pathways.

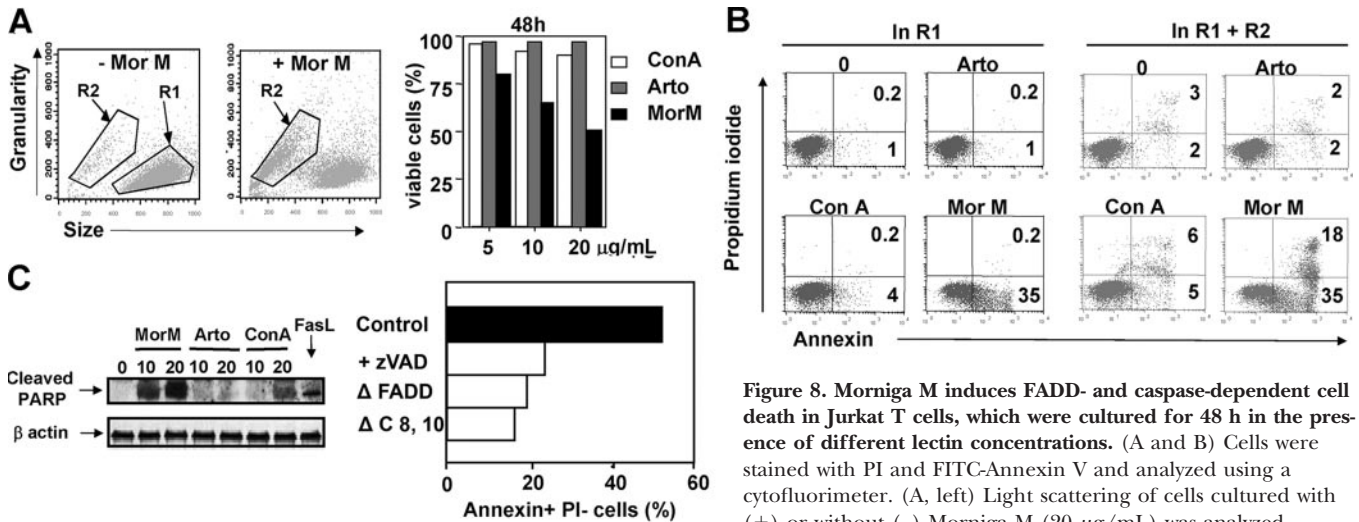
## DISCUSSION

Analysis of the binding capacity of FITC-labeled lectins toward lymphocytes at 4°C indicated that Morniga M, artocarpin, and Con A interact with T, B, and NK lymphocytes. However, under the experimental conditions used, Morniga M differs from Con A and artocarpin in that it displays a stronger binding with the entire population of lymphocytes. In addition, unlike the other FITC-labeled lectins, FITC-Morniga M is endocytosed rapidly and extensively by Jurkat T cells at 37°C. These data are indicative of major differences in oligosaccharide-binding specificity/affinity between lectins exhibiting apparently similar monosaccharide-binding specificity.

Many but not all plant lectins trigger physiological responses in animal cells upon interaction with glycoconjugates or glycolipids exposed on the cell surface. For example, mannose/glucose-specific Con A, one of the most famous plant lectins and the prototype of the legume lectin family, is a T cell mitogen *in vitro* [11, 12, 25]. In addition, Con A induces hepatitis in mice through activation of T and NK lymphocytes [26, 27]. Using PBMC, our results demonstrate that Morniga M and artocarpin activate T lymphocytes and NK cells *in vitro*. However,



**Figure 7. Biological effects of lectins on T lymphocytes are dependent on sugar recognition.** (A) Peripheral T lymphocytes were incubated for 6 h in the presence of a submitogenic concentration of PMA (0.3 ng/mL) and lectin at concentrations triggering maximal cell proliferation [Morniga M, 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (solid bars); artocarpin, 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (open bars)] in the presence or the absence of monosaccharide (20 mM). After washing and 2 days of culture, thymidine incorporation or CD25 expression (in a gate defined as in Fig. 6C) was evaluated. Values are calculated as percentage of control culture (addition of lectin+PMA without sugar) from the proliferation index or the percent of CD25-positive lymphocytes. Results are means of four donors  $\pm$  SD from two independent experiments. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.005$ , as compared with lectin + PMA-treated control cells. (B) Peripheral T lymphocytes were activated for 4 days with anti-CD3 mAb (OKT3, 10 ng/mL), anti-CD28 mAb (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), and IL-2 (100 UI/mL). After washing, activated T cells were incubated for 6 h with Morniga M (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) in the presence or absence of 20 mM galactose or methyl-mannose. After washing, cells were incubated further for 24 h, and cell death was analyzed by cytofluorimetry. (B, left) Representative results from one donor are shown. The percentage of cell death (Annexin-positive cells) is indicated. (Right) Results are means of four donors  $\pm$  SD from two independent experiments.



**Figure 8.** Morniga M induces FADD- and caspase-dependent cell death in Jurkat T cells, which were cultured for 48 h in the presence of different lectin concentrations. (A and B) Cells were stained with PI and FITC-Annexin V and analyzed using a cytofluorimeter. (A, left) Light scattering of cells cultured with (+) or without (-) Morniga M (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) was analyzed. (Right) Viable cells after lectin treatment are defined as An-

nexin-PI- cells in gate R1 + R2. Results are the means of two separate experiments. (B) Representative analysis of cell death in gates R1 and R1 + R2 of Jurkat T cells treated by 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  each lectin. Apoptotic cells and necrotic cells (probably as a result of postapoptotic necrosis) correspond to Annexin+ PI- cells and Annexin+ PI+ cells, respectively. Results are indicated as percentages of cells in each quadrant. (C, left) Western blot analysis of lectin-treated Jurkat T cells (10 or 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  lectin) using anticlaved PARP mAb. FasL (50 ng/mL) was used as a control for inducing apoptosis. (C, right) Parental (Control), FADD-deficient ( $\Delta$  FADD) or caspase 8- and 10-deficient ( $\Delta$  C 8, 10) Jurkat cells were cultured for 24 h in the presence of Morniga M (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), and then cell death was evaluated using a cytofluorimeter. Alternatively, parental Jurkat cells were co-incubated with Morniga M (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) + zVAD (40 mM). Values are means of duplicate and are representative of five independent experiments. The decrease of Morniga M-induced cell death was  $57 \pm 16\%$  in the presence of zVAD and  $67 \pm 23\%$  and  $73 \pm 11\%$  using FADD- or caspase-8- and -10-deficient Jurkat T cells, respectively (mean  $\pm$  SD,  $n=5$ ).

artocarpin activates, like Con A, some B (CD19+) lymphocytes, whereas Morniga M facilitates the selection of CD4+CD8+ DP cells. This particular CD8+CD4+/CD8+CD4- ratio might result from different mechanisms, such as the activation by Morniga M of some naive TCD8+CD4- cells known to express CD4 molecules once activated [28], the induction of CD8 upon activation of CD4+CD8- T cells [29], and the selection of spontaneous DP T lymphocyte cells [30]. The two first hypotheses are unlikely, because of the similar percentage of (activated) CD25+ CD8+ and CD25+ CD4+ T lymphocytes in Morniga M- and Con A-treated PBMC. More likely, Morniga M might favor the survival of pre-existing peripheral DP lymphocytes. It is worth noting, in this respect, that recent data have shown that Con A activates survival mechanisms that render DP lymphocytes resistant to cell death in the thymus [31]. Using isolated T lymphocytes, our results demonstrate that the lectins act directly on T cells, inducing proliferation and activation, with Morniga M more potent than artocarpin to trigger these biological effects. This difference is probably a result, at least partly, of strongest (or most numerous) interactions with glycans. Interestingly, addition of subactivating concentrations of anti-CD28 mAb or PMA increased the proliferation induced by both lectins. In addition, only the presence of these costimulating signals revealed the inhibitory effect of Morniga M on proliferation, suggesting that the inhibiting (toxic) potential of this lectin depends on a high level of T lymphocyte activation. Moreover, time-course experiments indicated that Morniga M-induced toxicity was well correlated with the activation level of T lymphocytes. Finally, Morniga M and artocarpin differ

strikingly in their capacity to trigger cytotoxicity toward activated PBMC, activated T lymphocytes, and Jurkat T cells.

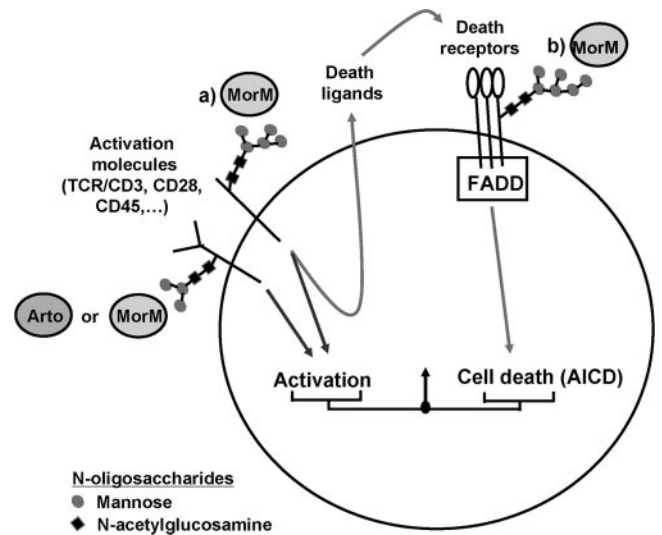
Taken together, the present results indicate that in spite of the high (85%) sequence identity, the virtually identical tertiary and quaternary structures, and a similar nominal sugar-binding specificity, artocarpin and Morniga M possess strikingly different biological activities. All three lectins included in our experiments are homotetramers of noncovalently associated protomers and possess apparently similar carbohydrate-binding sites in terms of network of hydrogen bonds (Fig. 1A). The tertiary and quaternary structure of Morniga M and artocarpin is nearly identical [18, 19] but is completely different from that of Con A [8]. As a result, the distance between contiguous carbohydrate-binding sites in Morniga M/artocarpin on the one hand and Con A on the other hand differs substantially. Consequently, the clear differential, biological effects of Morniga M and artocarpin on lymphocytes most probably depend on subtle differences in their oligosaccharide-binding specificities, involving the probable different size of the sugar-binding cavity (Fig. 1B). As a result, Morniga M can accommodate more bulky oligosaccharide chains than the other two lectins, which increase the range of target glycoconjugates and accordingly, also the range of "triggerable" signaling pathways in the target cells. The apparent plasticity (in terms of specificity promiscuity) of the carbohydrate-binding cavity of jacalin-related lectins has already been studied in some detail for jacalin [32] and Morniga-G, another predominantly galactose-specific lectin from the black mulberry bark [33, 34]. Artocarpin and Con A exhibit a rather similarly sized and shaped carbohy-

drate-binding cavity, suggesting that these two lectins accommodate the same or structurally similar N-glycan chains. However, artocarpin exerts weaker effects on lymphocytes (e.g., it induces the lowest cellular toxicity, T cell activation, membrane and cytosolic labeling), suggesting that the modulation of the physiological effects on target cells involved the structural difference between Con A and artocarpin homotetramers and/or subtle differences in the sugar-binding cavity.

However, from the present experiments, we cannot absolutely rule out that the observed differences between Morniga M and artocarpin were also a result of molecular variations outside of the glycan-recognition site. As a matter of fact, the mitogenic and activating effects on PBMC of the mannose-specific prokaryotic lectin cyanovirin are only partially a result of its carbohydrate-binding properties [35]. In addition, by analogy with the effects of animal lectins such as galectins [36], one can hypothesize that the biological effects of plant lectins do not depend solely on their interaction with cell surface oligosaccharides but are also a result of intracellular interactions occurring upon internalization.

Concerning the intracellular signaling mechanisms of Morniga M-induced T lymphocyte death, the present work indicates that cell death is, at least partly, a result of FADD- and caspase-dependent apoptosis, as demonstrated by PARP cleavage, and by the relative resistance to Morniga M-mediated toxicity of zVAD-treated cells and of FADD- or caspase-8 and -10-deficient Jurkat T cells. However, as with Con A, Morniga M might trigger other cell death mechanisms. Indeed, it was demonstrated recently that Con A induces a caspase-independent cell death including autophagy [37, 38]. As apoptosis and other kinds of cell death share the same characteristics in terms of Annexin V positivity [39], our present results cannot discriminate between both types of cell death. In addition, like Con A, Morniga M might trigger an increase in reactive oxygen species in the cytosol [40], a clustering of mitochondria [25], or some alterations of the mitochondrial membrane permeability inducing the release of apoptotic molecules, such as cytochrome c [25]. All of these events might be triggered by Morniga M and involved in caspase-dependent and caspase-independent cell death mechanisms.

Importantly, the present findings demonstrate that only Morniga M can induce AICD of T lymphocytes. This effect might involve, at least partly, a signaling pathway of FADD-dependent receptors (such as Fas or TRAIL-R). As Morniga M interacts more strongly with the cellular membrane and is more toxic toward lymphocytes than artocarpin, one can hypothesize that Morniga M interacts with more protein-linked oligosaccharides (probably N-glycans) than artocarpin. Thus, Morniga M might recognize oligosaccharides linked to activation molecules on a naive lymphocyte cell surface, as well as to molecules involved in cell death pathways in activated T lymphocytes (direct effect; Fig. 9). In addition, Morniga M might induce the release of cell death molecules from activated T cells (indirect effect; Fig. 9). Conversely, artocarpin might interact exclusively with N-glycans linked to activation molecules on naive lymphocytes. In agreement with this hypothesis, recent data using frontal affinity chromatography and 103 different N-glycans were allowed to class artocarpin and Morniga M



**Figure 9. Hypothetical interactions of Morniga M and artocarpin with T lymphocytes.** Both lectins can interact with small mannose-type N-glycans (two to three mannoses [9]), but only Morniga M could interact with high affinity with oligosaccharides containing mannose-rich glycans (greater than four) [9]. Morniga M and artocarpin could activate T cells after interactions with N-glycans linked to activation molecules (CD3/TCR, cosignaling molecules). Morniga M could induce AICD in activated lymphocytes, indirectly (a) by triggering expression of death molecules (such as FasL or TRAIL) or directly (b) by interaction with N-glycans linked to death receptors. In addition, N-glycan biosynthesis of membrane molecules can be modulated after lymphocyte activation that can alter the lectin reactivity with some CD molecules at the cell surface [6, 7].

in the same phylogenic M-JRL subgroup, characterized by their binding specificity/affinity for small high mannose-type glycans (two to six mannoses). However, artocarpin interacted with a maximal affinity [ $K_a=4 \times 10^{-5} (M^{-1})$ ] only with a three-mannose N-oligosaccharide, whereas Morniga M recognized [ $K_a \geq 4 \times 10^{-5} (M^{-1})$ ] two, three, five, and seven high mannose-type glycans [9]. In addition, only Morniga M demonstrated significant affinity for sialylated biantennary N-glycans.

Recent data indicate that jacalin, a galactose-specific lectin, can interact with CD45 and accordingly, can be involved in T cell activation [5]. T, B, and NK lymphocyte activation is a complex mechanism. T lymphocyte activation involves TCR/CD3 molecules and numerous molecules such as CD45 and CD28 family proteins [41]. In addition, various lymphocyte receptors, such as members of the TNFR family, control lymphocyte survival and death [42]. As all of these molecules are glycosylated differently, it is probable that Morniga M and artocarpin can interact differentially with molecules controlling activation, life, and death of lymphocytes. Several recent studies demonstrate that glycosylation on the T lymphocyte surface is modulated by activation, cell growth, and differentiation [7, 43, 44]. For instance, after activation, modulation of O-glycan biosynthesis controls CD8 T lymphocyte homeostasis by the way of variation in lymphocyte sensitivity to apoptosis [43]. Finally, O-glycosylation is also involved in the sensitivity of tumor cells to TRAIL-mediated apoptosis [44]. It is therefore tempting to



speculate that hypothetic endogenous mannose-binding lectins, interacting with N-glycans and with similar activity as artocarpin and Morniga M, can modulate the T lymphocyte survival/death balance.

An interesting observation reported here is that Morniga M triggers a dual response in T lymphocytes. Although mitogenicity was observed at low concentrations and after a short incubation time, cell death was induced at higher concentrations and longer times. In addition, cell death was likely induced in highly activated T cells. Con A shares, like Morniga M, cell death-inducing and -immunomodulating (on T and NK cells) activities. Considering that, it has been proposed recently as a molecule with potential anticancer activities. Indeed, Con A was shown to induce tumor cell death and/or stimulate immune responses toward tumor cells [45]. Along this line, recent data indicate that Con A selectively induces apoptosis in tumor cells lacking p53, thus suggesting that mannose-specific plant lectins could be used as chemotherapeutic agents in cancer treatment [46]. As artocarpin and Morniga M also exhibited some activating effect on T and NK cells, but differed by their toxic effects on the Jurkat T leukemia cell line, it will be interesting to evaluate the *in vitro* and *in vivo* anticancer activity of these two mannose-specific lectins against various tumor cells.

## ACKNOWLEDGMENTS

The financial support of the Université Paul Sabatier (H. B., B. S., A. B., P. R.), INSERM (H. B., B. S.), CNRS (R. C., A. B., P. R.), and Fund for Scientific Research-Flanders (E. J. M. V. D.) is gratefully acknowledged. We thank Dr. J. Blenis (Harvard Medical School, Boston, MA, USA) for providing FADD-deficient cells (12-1 Jurkat cells). We thank M. D. Pinteaux, C. Teisseire, C. Bousquet, and C. Taureau for their technical assistance.

## REFERENCES

- Nowell, P. C. (1960) Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. *Cancer Res.* **20**, 462–466.
- Lis, H., Sharon, N. (1986) Biological properties of lectins. In *The Lectins, Properties, Functions, and Applications in Biology and Medicine* (I. E. Liener, N. Sharon, I. J. Goldstein, eds.), Orlando, FL, USA, Academic, 265–291.
- Tamma, S. M., Balan, S. P., Chung, K. W., Pahwa, S. (2006) The lectin jacalin plus costimulation with anti-CD28 antibody induces phosphorylation of p38 MAPK and IL-4 synthesis-I. *J. Leukoc. Biol.* **79**, 876–880.
- Tamma, S. M., Chung, K. W., Patel, T. J., Balan, S. P., Pahwa, S. (2006) p38 MAPK plays a role in IL-4 synthesis in jacalin plus CD28-stimulated CD4+ T cells-II. *J. Leukoc. Biol.* **79**, 1339–1347.
- Baba, M., Yong Ma, B., Nonaka, M., Matsuiishi, Y., Hirano, M., Nakamura, N., Kawasaki, N., Kawasaki, N., Kawasaki, T. (2007) Glycosylation-dependent interaction of jacalin with CD45 induces T lymphocyte activation and Th1/Th2 cytokine secretion. *J. Leukoc. Biol.* **81**, 1002–1011.
- Rudd, P. M., Wormald, M. R., Stanfield, R. L., Huang, M., Mattsson, N., Speir, J. A., DiGennaro, J. A., Fetrow, J. S., Dwek, R. A., Wilson, I. A. (1999) Roles for glycosylation of cell surface receptors involved in cellular immune recognition. *J. Mol. Biol.* **293**, 351–366.
- Lau, K. S., Partridge, E. A., Grigorian, A., Silvescu, C. I., Reinhold, V. N., Demetriou, M., Dennis, J. W. (2007) Complex N-glycan number and degree of branching cooperate to regulate cell proliferation and differentiation. *Cell* **129**, 123–134.
- Wu, A. M., Song, S. C., Tsai, M. S., Herp, A. (2001) A guide to the carbohydrate specificities of applied lectins-2 (updated in 2000). *Adv. Exp. Med. Biol.* **491**, 551–585.
- Nakamura-Tsuruta, S., Uchiyama, N., Peumans, W. J., Van Damme, E. J., Totani, K., Ito, Y., Hirabayashi, J. (2008) Analysis of the sugar-binding specificity of mannose-binding-type jacalin-related lectins by frontal affinity chromatography—an approach to functional classification. *FEBS J.* **275**, 1227–1239.
- Van Damme, E. J. M., Peumans, W. J., Barre, A., Rougé, P. (1998) Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. *Crit. Rev. Plant Sci.* **17**, 575–692.
- Nagase, F., Abo, T., Hiramatsu, K., Suzuki, S., Du, J., Nakashima, I. (1998) Induction of apoptosis and tyrosine phosphorylation of cellular proteins in T cells and non-T cells by stimulation with concanavalin A. *Microbiol. Immunol.* **42**, 567–574.
- Wesch, D., Marx, S., Kabelitz, D. (1998) Monocyte-dependent death of freshly isolated T lymphocytes: induction by phorbol ester and mitogens and differential effects of catalase. *J. Immunol.* **161**, 1248–1256.
- Ohba, H., Bakalova, R., Muraki, M. (2003) Cytoagglutination and cytotoxicity of wheat germ agglutinin isolectins against normal lymphocytes and cultured leukemic cell lines: relationship between structure and biological activity. *Biochim. Biophys. Acta* **1619**, 144–150.
- Gastman, B., Wang, K., Han, J., Zhu, Z. U., Huang, X., Wang, G-Q., Rabinovitch, H., Gorelik, E. (2004) A novel apoptotic pathway as defined by lectin cellular initiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **316**, 263–271.
- Sankaranarayanan, R., Sekar, K., Banerjee, R., Sharma, V., Surolia, A., Vijayan, M. (1996) A novel mode of carbohydrate recognition in jacalin, a Moraceae plant lectin with a  $\beta$ -prism fold. *Nat. Struct. Biol.* **3**, 596–603.
- Lee, X., Thompson, A., Zhang, Z., Hoa, T-T., Biesterfeldt, J., Ogata, C., Xu, L., Johnston, R. A., Young, N. M. (1998) Structure of the complex of *Maclura pomifera* agglutinin and the T-antigen disaccharide, GalB1,3GalNAc. *J. Biol. Chem.* **273**, 6312–6318.
- Van Damme, E. J. M., Hause, B., Hu, J., Barre, A., Rougé, P., Proost, P., Peumans, W. J. (2002) Two distinct jacalin-related lectins with a different specificity and subcellular location are major vegetative storage proteins in the bark of the black mulberry tree. *Plant Physiol.* **130**, 757–769.
- Pratap, J. V., Jeyaprakash, A. A., Rani, P. G., Sekar, K., Surolia, A., Vijayan, M. (2002) Crystal structures of artocarpin, a Moraceae lectin with mannose specificity, and its complex with methyl- $\alpha$ -D-mannose: implications to the generation of carbohydrate specificity. *J. Mol. Biol.* **317**, 237–247.
- Rabijns, A., Barre, A., Van Damme, E. J. M., Peumans, W. J., De Ranter, C. J., Rougé, P. (2005) Structural analysis of the jacalin-related lectin Morniga M from the black mulberry (*Morus nigra*) in complex with mannose. *FEBS J.* **272**, 3725–3732.
- Nakamura, S., Yagi, F., Totani, K., Ito, Y., Hirabayashi, J. (2005) Comparative analysis of carbohydrate-binding properties of two tandem repeat-type jacalin-related lectins, *Castanea crenata* agglutinin and *Cycas revoluta* leaf lectin. *FEBS J.* **272**, 2784–2799.
- Bourne, Y., Houllès Astoul, C., Zamboni, V., Peumans, W. J., Menu-Bouaouiche, L., Van Damme, E. J. M., Barre, A., Rougé, P. (2002) The size, shape and specificity of the sugar-binding site of the jacalin-related lectins is profoundly affected by the proteolytic cleavage of the subunits. *Biochem. J.* **364**, 173–179.
- Milhas, D., Cuvillier, O., Therville, N., Clavé, P., Thomsen, M., Levade, T., Benoist, H., Séguin, B. (2005) Caspase-10 triggers Bid cleavage and caspase cascade activation in FasL-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* **280**, 19836–19842.
- Naismith, J. H., Emmerich, C., Habash, J., Harrop, S. J., Helliwell, J. R., Hunter, W. N., Raftery, J., Kalb, A. J., Yariv, J. (1994) Refined structure of concanavalin A complexed with methyl  $\alpha$  D-mannopyranoside at 2.0 Å resolution and comparison with the saccharide-free structure. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **50**, 847–858.
- Birebent, B., Lorho, R., Lechartier, H., de Guibert, S., Alizadeh, M., Vu, N., Beauptel, A., Robillard, N., Semana, G. (2004) Suppressive properties of human CD4+CD25+ regulatory T cells are dependent on CTLA-4 expression. *Eur. J. Immunol.* **34**, 3485–3496.
- Suen, Y. K., Fung, K. P., Choy, Y. M., Lee, C. Y., Chan, C. W., Kong, S. K. (2000) Concanavalin A induced apoptosis in murine macrophage PU5-1.8 cells through clustering of mitochondria and release of cytochrome c. *Apoptosis* **5**, 369–377.
- Xu, X., Wei, H., Dong, Z., Chen, Y., Tian, Z. (2006) The differential effects of low dose and high dose concanavalin A on cytokine profile and their importance in liver injury. *Inflamm. Res.* **55**, 144–152.
- Ajuebor, M. N., Wondimu, Z., Hogaboam, C. M., Le, T., Proudfoot, A. E., Swain, M. G. (2007) CCR5 deficiency drives enhanced natural killer cell trafficking to and activation within the liver in murine T cell-mediated hepatitis. *Am. J. Pathol.* **170**, 1975–1988.
- Sullivan, Y. B., Landay, A. L., Zack, J. A., Kitchen, S. G., Al-Harhi, L. (2001) Upregulation of CD4+CD8+ T cells: CD4dimCD8bright T cells constitute an activated phenotype of CD8+ T cells. *Immunology* **103**, 270–280.
- Paliard, X., Malefijt, R. W., de Vries, J. E., Spits, H. (1988) Interleukin-4 mediates CD8 induction on human CD4+ T-cell clones. *Nature* **335**, 642–644.
- Kay, N. E., Bone, N., Hupke, M., Dalmaso, A. P. (1990) Expansion of a lymphocyte population co-expressing T4 (CD4) and T8 (CD8) antigens in the peripheral blood of a normal adult male. *Blood* **75**, 2024–2029.
- Pongracz, J., Parnell, S., Anderson, G., Jaffrézou, J. P., Jenkinson, E. (2003) Con A activates an Akt/PKB dependent survival mechanism to modulate TCR induced cell death in double positive thymocytes. *Mol. Immunol.* **39**, 1013–1023.

32. Raval, S., Gowda, S. B., Singh, D. D., Chandra, N. R. (2004) A database analysis of jacalin-like lectins: sequence-structure-function relationships. *Glycobiology* **14**, 1247–1263.
33. Rougé, P., Peumans, W. J., Barre, A., Van Damme, E. J. M. (2003) A structural basis for the difference in specificity between the two jacalin-related lectins from mulberry (*Morus nigra*) bark. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **304**, 91–97.
34. Van Damme, E. J. M., Rougé, P., Peumans, W. J. (2007) Carbohydrate-protein interactions: plant lectins. In *Comprehensive Glycoscience—From Chemistry to Systems Biology*, New York, NY, USA, Elsevier, 563–599.
35. Balzarini, J., Van Laethem, K., Peumans, W. J., Van Damme, E. J., Bolmstedt, A., Gago, F., Schols, D. (2006) Mutational pathways, resistance profile, and side effects of cyanovirin relative to human immunodeficiency virus type 1 strains with N-glycan deletions in their gp120 envelopes. *J. Virol.* **80**, 8411–8421.
36. Fukumori, T., Oka, N., Takenaka, Y., Nangia-Makker, P., Elsamman, E., Kasai, T., Shono, M., Kanayama, H. O., Ellerhorst, J., Lotan, R., Raz, A. (2006) Galectin-3 regulates mitochondrial stability and antiapoptotic function in response to anticancer drug in prostate cancer. *Cancer Res.* **66**, 3114–3119.
37. Lei, H. Y., Chang, C. P. (2007) Induction of autophagy by concanavalin A and its application in anti-tumor therapy. *Autophagy* **3**, 402–404.
38. Chang, C. P., Yang, M. C., Liu, H. S., Lin, Y. S., Lei, H. Y. (2007) Concanavalin A induces autophagy in hepatoma cells and has a therapeutic effect in a murine in situ hepatoma model. *Hepatology* **45**, 286–296.
39. Galluzzi, L., Maiuri, M. C., Vitale, I., Zischka, H., Castedo, M., Zitvogel, L., Kroemer, G. (2007) Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ.* **14**, 1237–1266.
40. Pani, G., Colavitti, R., Borrello, S., Galeotti, T. (2000) Endogenous oxygen radicals modulate protein tyrosine phosphorylation and JNK-1 activation in lectin-stimulated thymocytes. *Biochem. J.* **347** (Pt. 1), 173–181.
41. Zamoyska, R. (2007) Why is there so much CD45 on T cells? *Immunity* **27**, 421–423.
42. Krammer, P. H., Arnold, R., Lavrik, I. N. (2007) Life and death in peripheral T cells. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 532–542.
43. Van Dyken, S. J., Green, R. S., Marth, J. D. (2007) Structural and mechanistic features of protein O glycosylation linked to CD8+ T-cell apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 1096–1111.
44. Wagner, K. W., Punnoose, E. A., Januario, T., Lawrence, D. A., Pitti, R. M., Lancaster, K., Lee, D., von Goetz, M., Yee, S. F., Totpal, K., Huw, L., Katta, V., Cavet, G., Hymowitz, S. G., Amler, L., Ashkenazi, A. (2007) Death-receptor O-glycosylation controls tumor-cell sensitivity to the proapoptotic ligand Apo2L/TRAIL. *Nat. Med.* **13**, 1070–1077.
45. Miyagi, T., Takehara, T., Tatsumi, T., Suzuki, T., Jinushi, M., Kanazawa, Y., Hiramatsu, N., Kanto, T., Tsuji, S., Hori, M., Hayashi, N. (2004) Concanavalin A injection activates intrahepatic innate immune cells to provoke an antitumor effect in murine liver. *Hepatology* **40**, 1190–1196.
46. Amin, A. R., Paul, R. K., Thakur, V. S., Agarwal, M. L. (2007) A novel role for p73 in the regulation of Akt-Foxo1a-Bim signaling and apoptosis induced by the plant lectin, Concanavalin A. *Cancer Res.* **67**, 5617–5621.

---

**KEY WORDS:**

*Morus nigra* · Jurkat T cells · AICD · FADD · caspase · endocytosis



### III-1-1-3 Discussion de l'article 1:

Les deux m-JRLs MorM et Artocarpine, dont la spécificité monosaccharidique est identique, induisent des effets biologiques différents, dépendants de la dose et du temps, sur des lymphocytes humains. Les résultats montrent que MorM interagit plus fortement avec tous les types cellulaires étudiés, c'est-à-dire des PBMC (mélange de lymphocytes B, T, NK et de monocytes), des lymphocytes T sains et des lymphocytes T leucémiques de type Jurkat, en comparaison de Arto, confirmant le fait que MorM interagit avec une plus grande variété d'oligosaccharides. De plus, contrairement à Arto qui est faiblement endocytée, MorM est rapidement internalisée dans la lignée cellulaire de lymphocytes T leucémiques Jurkat, et de manière glycane-dépendante, suggérant qu'elle puisse interagir également avec des constituants glycosylés cytosoliques (*Fig. 21*). Ainsi, MorM peut vraisemblablement déclencher une plus grande variété de voies de signalisation que Arto dans les lymphocytes T, induisant l'activation lymphocytaire à faible dose et la mort cellulaire à plus forte dose.

Les effets biologiques de MorM montrent une activité immuno-potentialisatrice et toxique dose-dépendante. Après 24 h de contact à faible dose, MorM (5 µg/ml) et Arto (10 µg/ml) induisent la prolifération de PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) prélevés chez des patients sains et activent principalement les populations lymphocytaires T et NK. MorM possède une capacité d'activation plus grande que Arto pour les lymphocytes T (respectivement, 45% contre 25% de lymphocytes T activés). Dans la population de lymphocytes T, MorM est capable d'activer les CD4+, les CD8+ et, de manière intéressante, favorise l'émergence d'une population de lymphocytes T doublement positifs CD4+/CD8+, décrits comme possédant un rôle régulateur [315].

A forte dose (20 µg/ml), contrairement à Arto, MorM devient toxique pour les PBMC activés et les lymphocytes T activés. En effet, alors qu'elle n'est pas toxique sur les lymphocytes T au repos isolés (comprenant des lymphocytes T naïfs CD45RA+ et des lymphocytes T mémoire CD45RO+ non activés), MorM induit une mort cellulaire apoptotique sur des lymphocytes T activés isolés. Elle est capable d'induire une mort cellulaire par AICD (Activating Induced Cell Death), processus clé dans la régulation de l'homéostasie lymphocytaire. Cette mort cellulaire est inhibable par des sucres. Physiologiquement, l'AICD est induite par l'intermédiaire des récepteurs de mort de la famille du TNF-R [316].

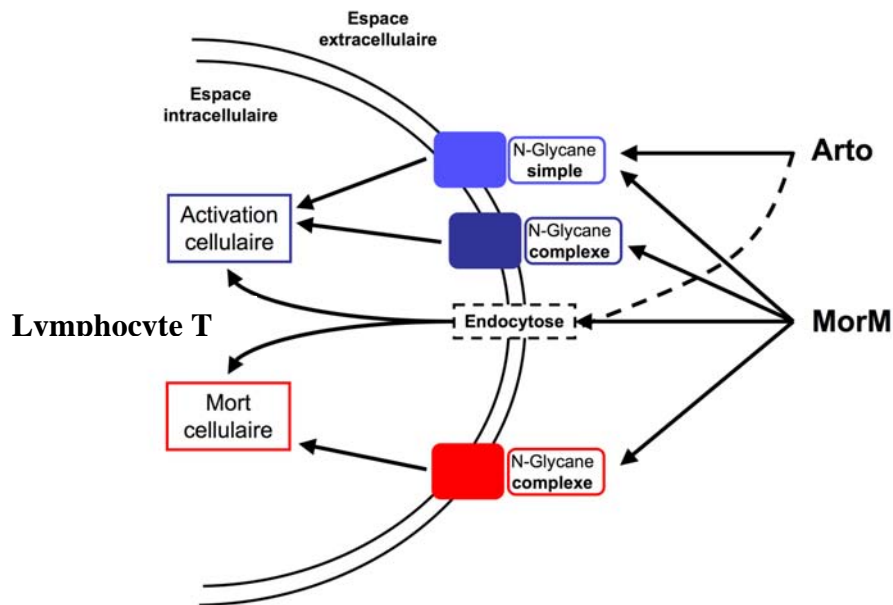
Sur les cellules Jurkat, la cytotoxicité induite par MorM est caractérisée par l'activation de protéines impliquées dans l'apoptose médiée par les récepteurs de mort. En

effet, l'activation des caspases initiatrices 8 et 10, la nécessité de la protéine adaptatrice FADD et le clivage de PARP suggèrent l'importance de la voie de signalisation apoptotique engagée par les récepteurs de mort FADD-dépendants, comme par exemple le Fas (CD95) ou le TNF-R1 (CD120a). La lignée cellulaire Jurkat exprime constitutivement les récepteurs de mort TNF-R1, Fas et TRAIL-R2 (CD262 ou DR5). Parmi ces molécules, seuls les récepteurs TNF-R1 et Fas sont susceptibles d'interagir avec MorM puisqu'ils sont uniquement N-glycosylés tandis que DR5 ne l'est pas (*Tab. 7*). Il est donc possible d'imaginer que MorM puisse induire la mort des lymphocytes T activés, en partie en interagissant avec Fas et/ou TNF-R1.

De plus, d'après les études de cytotoxicité consacrées à la lectine ConA, d'autres mécanismes de mort pourraient être impliqués. Con A peut déclencher une mort apoptotique et/ou autophagique en faisant intervenir la mitochondrie [131,136]. De façon analogue, pour MorM, le déclenchement de ces processus de mort cellulaire peut être dû à la fixation de la lectine au niveau de récepteurs membranaires et/ou à son endocytose conduisant à la régulation de certaines protéines cytosoliques (*Fig. 20*).

Ces observations montrent la capacité des lectines végétales à discriminer des structures glycaniques complexes exprimées à la surface des cellules humaines, et en particulier des cellules du système immunitaire. En effet, alors que MorM et Arto révèlent une spécificité monosaccharidique identique, elles se distinguent par la finesse de la reconnaissance de glycanes complexes. Ces deux lectines n'interagissent vraisemblablement pas avec le même panel de glycoconjugués (glycoprotéines et glycolipides) puisqu'elles n'entraînent pas les mêmes effets cellulaires. En contexte non pathologique, il semble que MorM soit cytotoxique uniquement sur les lymphocytes T activés et non sur les lymphocytes T naïfs. Comme l'activation lymphocytaire est accompagnée de changements de la glycosylation, MorM pourrait interagir avec des structures N-glycaniques exprimées après l'activation des lymphocytes.

En résumé, Artocarpine interagirait avec un nombre restreint de chaînes N-oligosaccharidiques portées par des molécules d'activation lymphocytaire (par exemple CD3, CD4 et CD28), alors que MorM interagirait avec un panel plus large de structures N-oligosaccharidiques (*Fig. 20*). Parmi les N-glycoconjugués reconnus par MorM, pourraient figurer des molécules activatrices (comme par exemple, CD3, CD4 et CD28), mais aussi, après activation, des récepteurs de mort (Fas et TNF-R1). Une variation de la N-glycosylation liée à l'activation pourrait venir moduler ces interactions.



**Figure 20 :** Interactions hypothétiques de MorM et Arto avec les lymphocytes T. Contrairement à Artocarpine, Morniga M possède à la fois une activité immunopotentialisatrice et toxique sur les lymphocytes T. MorM interagirait avec une variété plus grande de cibles glycaniques, générant des effets biologiques plus amplifiés que son homologue Artocarpine. De plus, MorM peut être endocytée, favorisant d'autres mécanismes de signalisation aboutissant certainement à l'activation et/ou la mort cellulaire selon la dose utilisée.

Marqueur de différenciation (ou CD)	Nombre de sites potentiels de glycosylation	
	N-glycosylation	O-glycosylation
<b>Molécules d'activation</b>		
CD16a (TcR $\alpha$ )	4	0
CD16b (TcR $\beta$ )	4	0
CD3 $\gamma$	2	0
CD3 $\delta$	2	0
CD3 $\epsilon$	0	0
CD3 $\zeta$	0	0
CD4	2	0
CD8	1	7
CD28	5	0
<b>Récepteurs de mort</b>		
CD95 (Fas)	3	0
CD120a (TNF-R1)	2	0
CD261 (DR4 ou TRAIL-R1)	1	5
CD262 (DR5 ou TRAIL-R2)	0	5
<b>Antigènes Pan-leucocytaires</b>		
CD7	2	5
CD34	9	40
CD45RO	11	0
CD45RA	3	4
CD45RB	0	3
CD45RC	2	4

**Tableau 7 :** Glycosylations potentielles de quelques CD (Cluster of Differentiation). D'après "Leukocyte and Stromal Cell Molecules, The CD markers, Wiley-Liss, 2007" [317] et le logiciel de prédiction de sites glycosylés NetNGlyc et NetOGlyc disponibles sur le serveur bioinformatique ExPASy

## **III-1-2 Morniga G :**

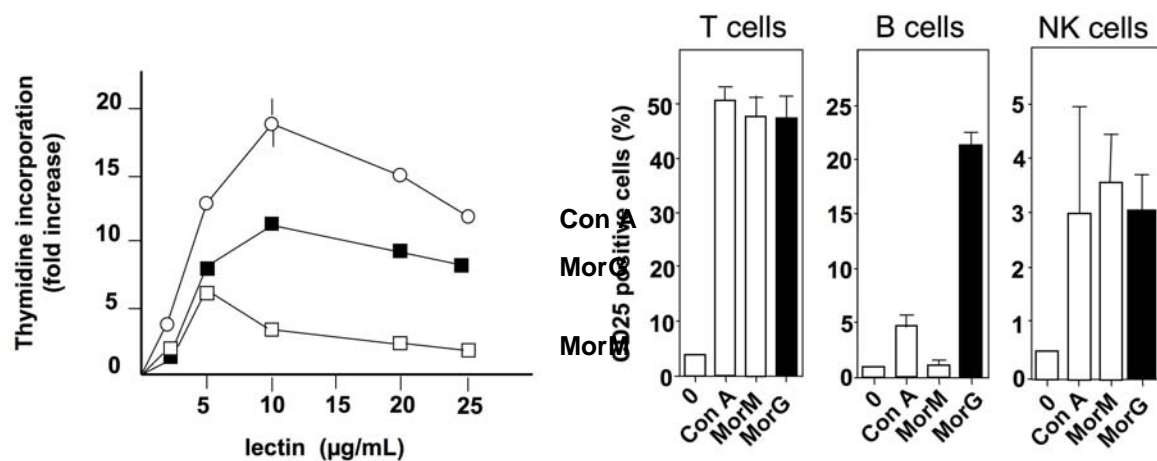
### **III-1-2-1 Introduction de l'article 2 :**

Nous pensons utiliser MorG comme vecteur de molécules anticancéreuses, et notamment comme vecteur de photosensibilisants. La connaissance des effets biologiques du vecteur est une étape indispensable au projet. Etant donné que les lectines végétales sont connues pour leurs effets immunomodulateurs, une étude des effets activateurs et cytotoxiques de Morniga G a été réalisée sur des PBMC, des lymphocytes T sains et des lymphocytes T leucémiques de type Jurkat. Les études préalables à ce travail suggèrent que MorG interagit très fortement avec les antigènes glycaniques associés aux tumeurs T (CD176) et Tn (CD175) sous forme clusterisée [177]. Dans ce travail, nous avons, dans un premier temps, comparé les effets biologiques de deux lectines phylogénétiquement et structuralement très proches mais dont les spécificités glycaniques sont différentes. En effet, alors que MorG interagirait préférentiellement avec les glycoconjugués *O*-glycosylés [177], MorM interagirait préférentiellement avec des glycoconjugués *N*-glycosylés [318]. Dans un second temps, l'effet toxique de MorG a été plus particulièrement étudié.

### **III-1-2-2 Article 2 : Morniga G might induce a TRAIL-R dependent apoptosis :**

#### *III-1-2-2-1 Effets immunomodulateurs de Morniga G :*

Tout d'abord, les effets immunomodulateurs de MorG ont été évalués sur des PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) prélevées chez des patients sains. Un pic de prolifération à 10 µg/ml est observé après 3 jours de culture en présence de la lectine. Elle est également capable d'activer, à la dose correspondant à celle du pic de prolifération, les 3 sous-populations lymphocytaires T, B et NK. Contrairement à des lectines spécifiques du mannose, telles que Con A et MorM, MorG est capable d'activer également les lymphocytes B (*Fig. 21*).

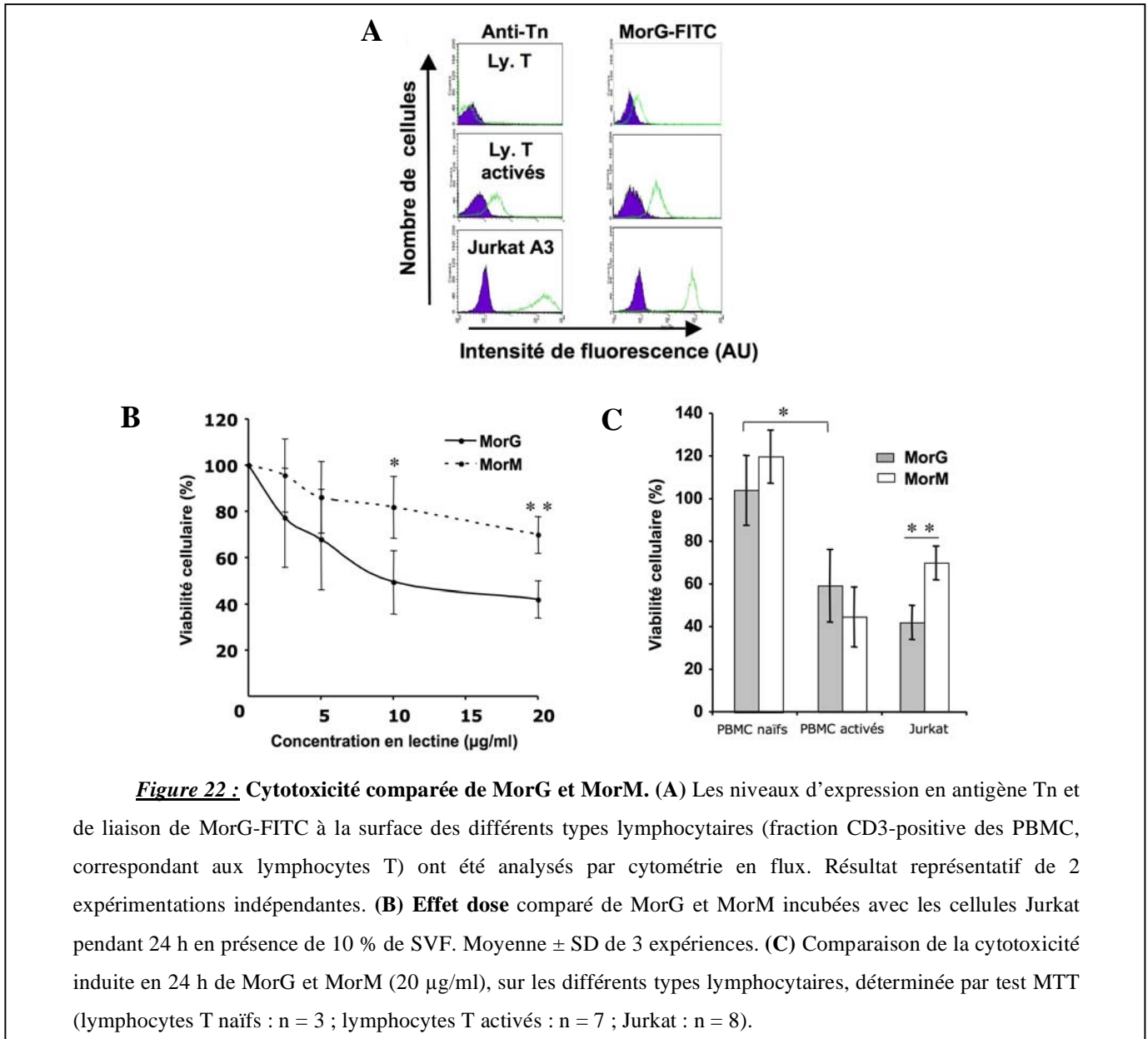


**Figure 21: Effets immunomodulateurs des lectines.** A gauche, effet mitogénique de différentes lectines sur des PBMC prélevés chez des patients sains. La prolifération est évaluée par l'incorporation de thymidine tritiée après 3 jours de culture en présence de lectine. A droite, effets activateurs des lectines sur les différentes sous-populations lymphocytaires. Le marqueur d'activation est l'expression du CD25 pour les cellules CD3+ (lymphocytes T), CD19+ (lymphocytes B) et CD56+ (cellules NK).

### III-1-2-2-2 Cytotoxicité induite par Morniga G sur les lymphocytes T:

La cytotoxicité de MorG a été évaluée sur des PBMC naïves et activées et sur la lignée cellulaire T leucémique Jurkat. L'activation des PBMC est réalisée par un cocktail anti-CD3, Il-2 et anti-CD28. Après 72 h de culture, 90 % des PBMC sont des lymphocytes T. Tout d'abord, l'expression de l'antigène Tn par les différents types cellulaires a été étudiée par cytofluorimétrie à l'aide d'un anticorps anti-CD175 (Fig. 22A). Les résultats montrent une expression différentielle de l'antigène Tn selon les types cellulaires étudiés : Jurkat >> lymphocytes T activés > lymphocytes T au repos. De plus, le niveau d'interaction de la lectine couplée à la fluorescéine (MorG-FITC) est corrélé au niveau d'expression en antigènes Tn, mettant en avant l'interaction potentielle de MorG avec les antigènes Tn exprimés à la surface des cellules (Fig. 22A). Les expériences montrent que la cytotoxicité de MorG est dépendante de la dose et significativement supérieure à la cytotoxicité induite par MorM (Fig. 22B). Après 24 h de contact, MorG entraîne un effet maximal à 20 µg/ml sur les cellules Jurkat, soit environ 60 % de mort cellulaire. De plus, les cellules leucémiques semblent être plus sensibles à la cytotoxicité induite par MorG que des lymphocytes T naïfs ( $\leq 10\%$  de toxicité) ou activés ( $\cong 40\%$  de toxicité) (Fig. 22C). L'expression de l'antigène Tn, la réactivité et la toxicité de MorG sur les différentes populations cellulaires étudiées semblent être corrélées positivement (Fig. 22). Donc, comme son homologue MorM, MorG présente

une toxicité sur les lymphocytes activés et les lymphocytes leucémiques. En revanche, ces deux lectines présentent des spécificités glycaniques différentes et interagissent certainement avec des glycoconjugués membranaires différents. Ainsi, nous nous sommes intéressés aux mécanismes intracellulaires potentiellement induits par MorG.

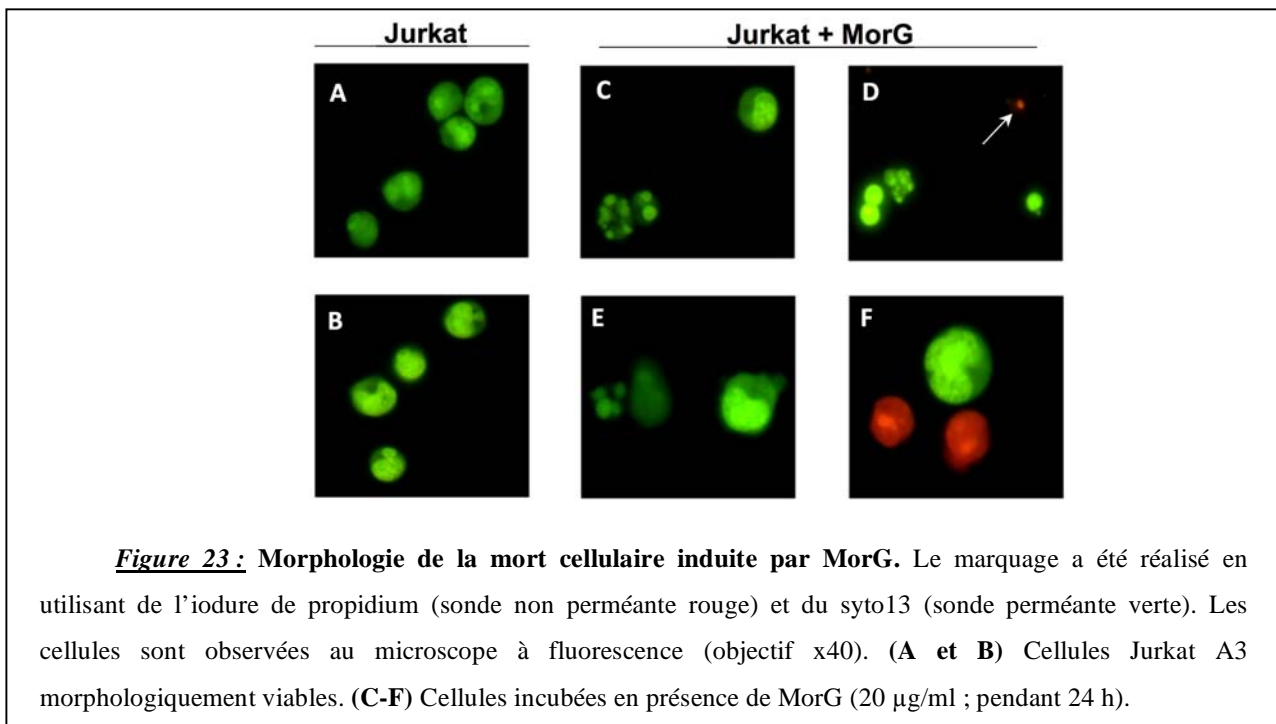


### III-1-2-2-3 Mécanismes cytotoxiques induits par Morniga G sur les cellules

#### Jurkat :

Une analyse morphologique par microscopie à fluorescence de la mort cellulaire des cellules Jurkat A3 induite par MorG a été réalisée. Des cellules en apoptose avec

condensation de la chromatine et du cytoplasme et fragmentation nucléaire sont majoritairement observées (*Fig. 23C-E*). De plus, des cellules en nécrose présentant un gonflement cellulaire (*Fig. 23E, 23F* ; début d'oncose, maintient de l'imperméabilité à l'iodure de propidium) ou en nécrose post-apoptotique (*Fig. 23D* ; cellules marquées par l'iodure de propidium mais présentant également une fragmentation nucléaire) sont également présentes.

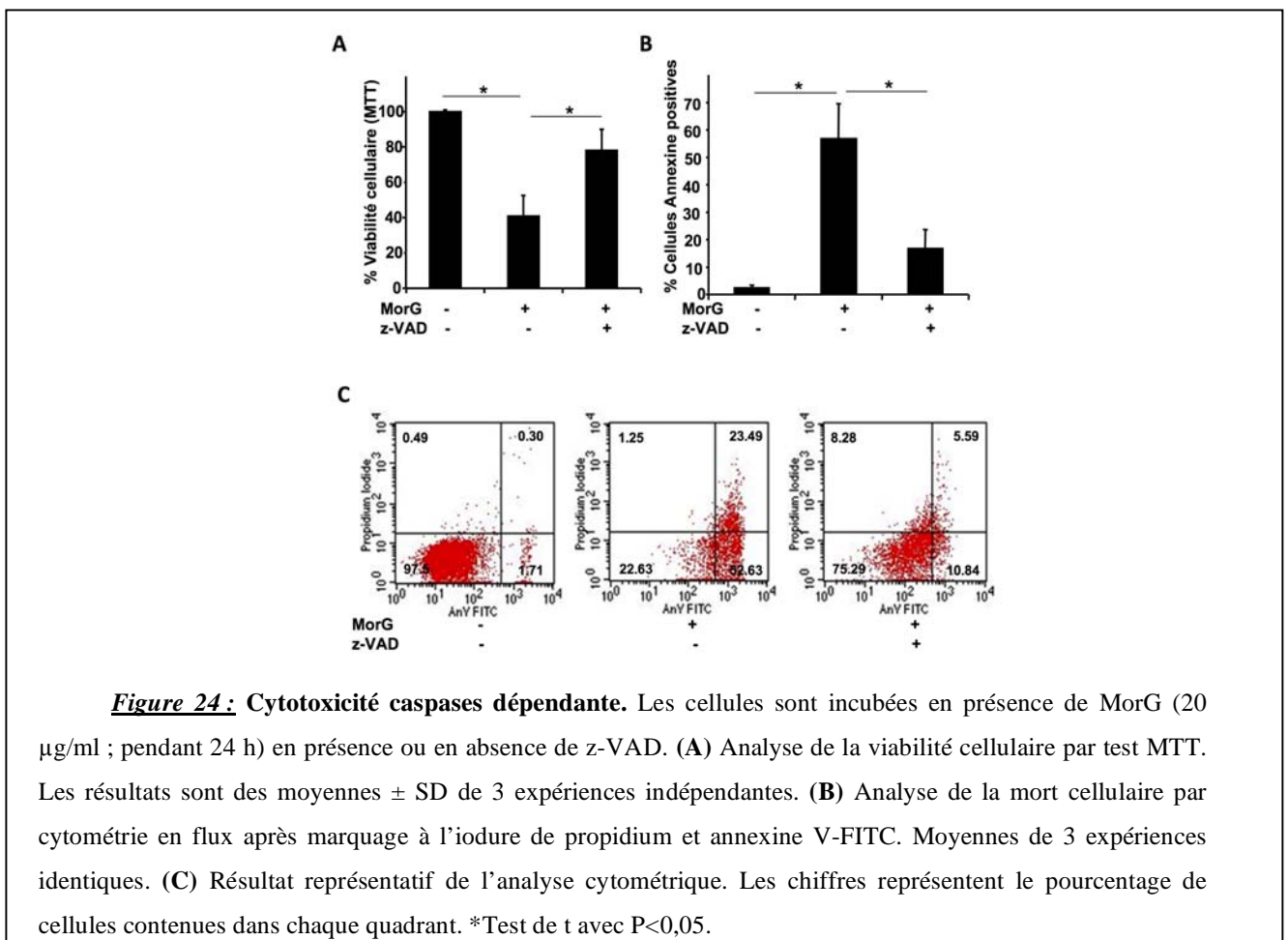


**Figure 23 :** Morphologie de la mort cellulaire induite par MorG. Le marquage a été réalisé en utilisant de l'iodure de propidium (sonde non perméante rouge) et du syto13 (sonde perméante verte). Les cellules sont observées au microscope à fluorescence (objectif x40). (A et B) Cellules Jurkat A3 morphologiquement viables. (C-F) Cellules incubées en présence de MorG (20 µg/ml ; pendant 24 h).

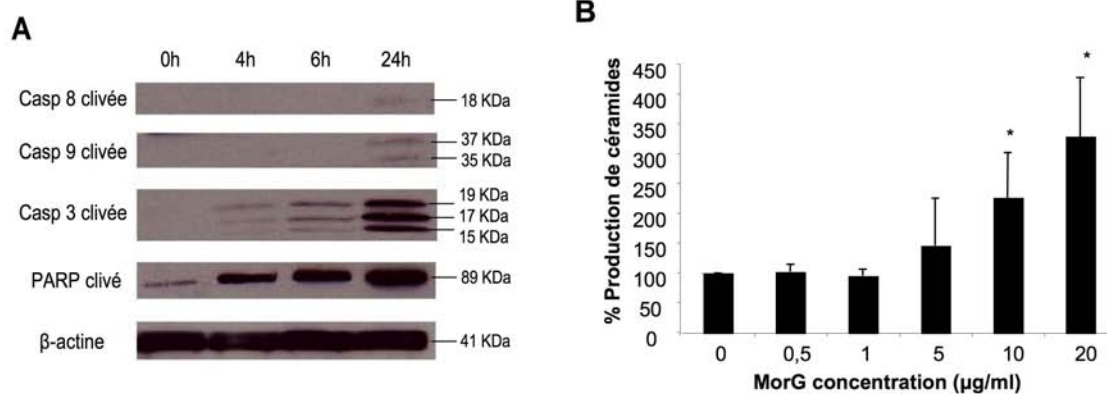
La mort cellulaire induite par MorG étant majoritairement de morphologie apoptotique, nous avons étudié l'implication des caspases. Ces protéases sont activées pendant la signalisation apoptotique [245]. Ainsi, les cellules Jurkat A3 ont été traitées par MorG en présence de z-VAD. Cet inhibiteur à spectre large des caspases est capable d'inhiber significativement la cytotoxicité induite par MorG (*Fig. 24*). Ces résultats confirment que MorG induit une mort cellulaire majoritairement apoptotique (la majorité des cellules étant Annexine V-positives, ce qui correspond à l'externalisation des phosphatidylsérine) et mettent en avant la participation des caspases dans le processus cytotoxique. Leur activation a été confirmée par western blot (*Fig. 25A*). Le clivage de la caspase-3 effectrice et de PARP, cible moléculaire des caspases effectrices, apparaît dès 4 h de contact avec Morniga G. Un clivage de la caspase-8 (caspase initiateur de la voie extrinsèque) et de la caspase-9 (caspase initiateur de la voie intrinsèque mitochondriale) est observé à 24 h. Le clivage de la caspase-8 étant initié après la formation du DISC (Death Inducing Signaling Complex), ces résultats

suggèrent une implication des récepteurs de mort FADD-dépendants appartenant à la famille du TNF-R (Fas, TNF-R1 et TRAIL-R2) dans la cytotoxicité induite par MorG.

Enfin, les céramides sont des sphingolipides reconnus pour leur rôle de messagers secondaires dans de nombreux processus biologiques, tels que l'apoptose médiée par les récepteurs de mort [253,319]. Les céramides ont été dosés après incubation des cellules en présence de MorG. Une accumulation de céramides est observée avec 10 et 20 µg/ml de Morniga G, après 24 h de contact (*Fig. 25B*), compatible avec l'induction d'une signalisation apoptotique.



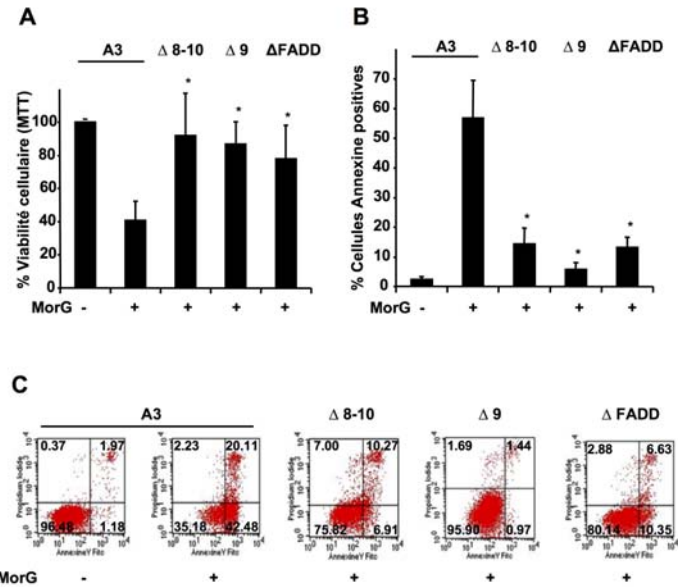




**Figure 25 :** Caractérisation biochimique de la mort cellulaire. (A) Clivage des caspases : les cellules Jurkat A3 sont incubées avec Morniga G (20 µg/ml) pendant 4h, 6h ou 24h. L'activation des caspases est évaluée par Western blot en utilisant des anticorps anti-caspase 8, anti-caspase 9, anti-caspase 3 ou anti-PARP. L'anticorps anti-β-actine est utilisé comme contrôle. Résultat correspondant à une expérimentation. (B) Dosage du céramide : les cellules Jurkat A3 sont incubées avec 0,5, 1, 5, 10 ou 20 µg/ml de Morniga G. Le céramide endogène contenu dans les cellules est évalué par la méthode à la DAG kinase après 24h d'incubation. Moyennes de 4 expérimentations indépendantes. \*Test de t avec P<0,05.

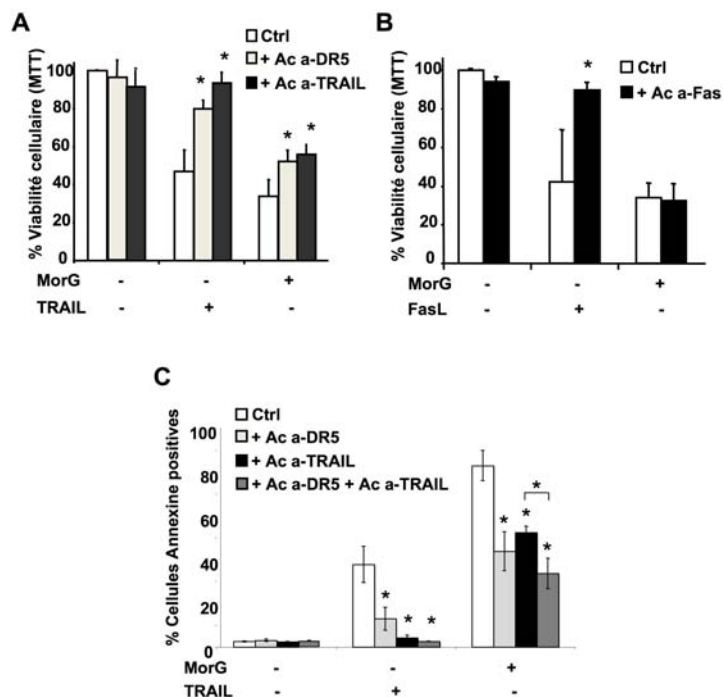
#### III-1-2-2-4 Implication des récepteurs de mort et de la O-glycosylation :

Les résultats précédents suggèrent un rôle probable des récepteurs de mort et des caspases dans l'apoptose. Les cellules Jurkat déficientes pour la protéine adaptatrice FADD ( $\Delta$ FADD), mais aussi pour les caspases 8 et 10 ( $\Delta$  8-10), ou pour la caspase 9 ( $\Delta$  9), ont été utilisées. Chacune de ces lignées présente un niveau équivalent d'expression des récepteurs de mort (Fas, DR5 et TNF-R1), des antigènes Tn et de réactivité avec la lectine MorG (données non montrées). Les résultats montrent la résistance des lignées déficientes à la cytotoxicité induite par MorG (Fig. 26), mettant en avant l'implication des récepteurs de mort dépendants de FADD et des caspases 8, 9 et 10.



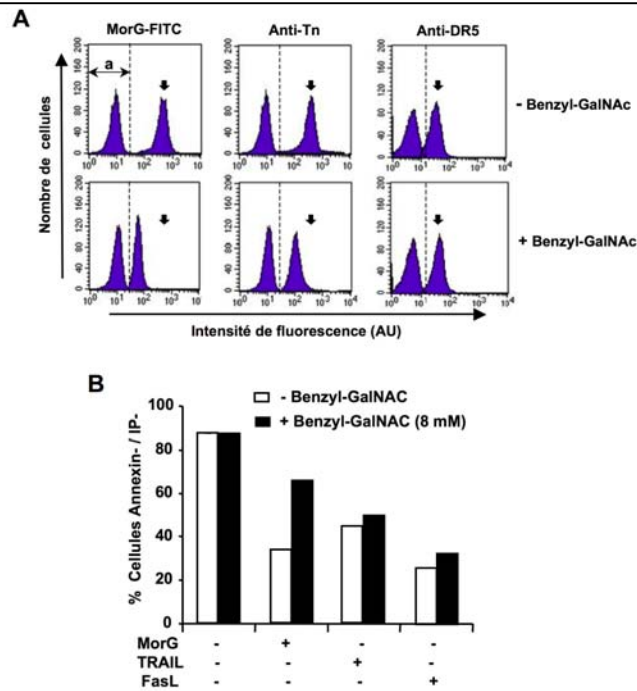
**Figure 26 :** MorG induit une cytotoxicité caspases-8, -9, -10 et FADD-dépendante. Les cellules sont incubées en présence de MorG (20 µg/ml ; pendant 24 h). (A) Analyse de la viabilité cellulaire par test MTT. Les résultats sont des moyennes ± SD de 3 expérimentations indépendantes. (B) Analyse de la mort cellulaire par cytométrie en flux après marquage à l'iodure de propidium et annexine V-FITC. L'analyse est effectuée dans une fenêtre définie comme contenant les lymphocytes apparemment viables selon les paramètres de tailles et granulosités. Moyennes de 3 expérimentations identiques. (C) Résultat représentatif de l'analyse cytométrique. Les chiffres représentent le pourcentage de cellules contenues dans chaque quadrant. \*Test de t avec  $P < 0,05$ .

Parmi les récepteurs de mort présents à la surface des cellules Jurkat, les récepteurs Fas et TNF-R1 sont *N*-glycosylés et ne possèdent pas de sites potentiels de *O*-glycosylation. A l'inverse, DR5 est uniquement *O*-glycosylé et ne présente aucun site de *N*-glycosylation [6] (Tab. 7). Ce récepteur est donc une cible potentielle de la lectine MorG. De façon intéressante, les résultats utilisant des anticorps monoclonaux neutralisant les récepteurs de mort suggèrent que seul le récepteur DR5 participerait à la cytotoxicité induite par MorG sur les cellules Jurkat. En effet, alors que les anticorps neutralisant le DR5 sont efficaces pour inhiber la cytotoxicité induite par MorG (Fig. 27A), l'utilisation d'anticorps neutralisant Fas n'ont aucun effet (Fig. 27B). De plus, l'utilisation d'un anticorps bloquant le ligand naturel TRAIL du récepteur DR5, seul ou en association avec l'anticorps bloquant le récepteur, inhibe également la toxicité induite par MorG (Fig. 27C). Ce résultat suggère que MorG peut également induire la sécrétion de ligand TRAIL qui, à son tour, va se lier à son récepteur.



**Figure 27 : Implication du récepteur de mort DR5.** Les cellules Jurkat A3 sont pré-incubées pendant 1h avec ou sans anticorps neutralisant TRAIL, DR5 ou Fas puis co-incubées avec ou sans MorG (20 µg/mL), TRAIL (50 ng/mL) ou FasL (50 ng/mL), pendant 24 h. (A et B) Analyse de la viabilité cellulaire par test MTT. Les résultats sont des moyennes de triplicata de 3 expérimentations indépendantes. (C) Analyse de la mort cellulaire par cytométrie en flux après marquage à l'iodure de propidium et annexine V-FITC. L'analyse est effectuée dans une fenêtre définie comme contenant les lymphocytes apparemment viables selon les paramètres de tailles et granulosités. Moyennes de 3 expérimentations identiques. \*Test de t avec  $P < 0,05$ .

MorG présente une spécificité d'interaction d'affinité croissante pour le galactose, la *N*-acétyl-galactosamine et surtout les antigènes T et Tn [177]. Ce dernier est la première étape de la biosynthèse de la majorité des chaînes *O*-glycaniques [3,12]. En conséquence, la cytotoxicité de MorG a été évaluée après inhibition de la *O*-glycosylation. Après 72 h d'incubation en présence d'un inhibiteur de la *O*-glycosylation (le benzyl-GalNAc), l'expression de l'antigène Tn et la liaison de MorG-FITC à la surface des cellules Jurkat sont fortement inhibées (Fig. 28A). À l'inverse, la détection de DR5 par un anticorps monoclonal dirigé contre un épitope peptidique de DR5 n'est pas altérée, montrant que l'inhibiteur n'affecte pas l'expression protéique du récepteur de mort (Fig. 28A). Dans ces conditions, le benzyl-GalNAc permet de protéger les cellules Jurkat de la mort induite par la lectine, mais pas par TRAIL ou FasL (Fig. 28B).

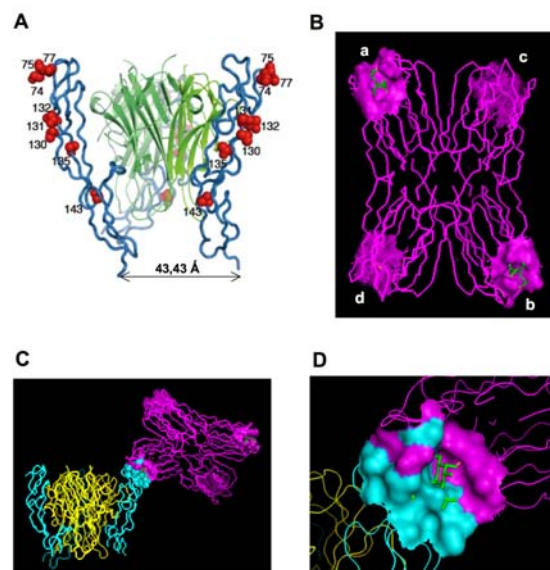


**Figure 28 : Rôle de la O-glycosylation.** Les cellules Jurkat A3 sont pré-incubées pendant 72h avec ou sans Benzyl-GalNAc (8 mM) puis co-incubées avec ou sans Morniga G (20 µg/ml) pendant 24h. **(A)** Marquage des cellules avec la lectine fluorescente, des anticorps anti-Tn ou anti-DR5. La flèche noire correspond au pic de fluorescence des cellules non traitées par le Benzyl-GalNAc. Résultats représentatifs de 2 expérimentations, **a** = autofluorescence. **(B)** Analyse de la mort cellulaire par cytométrie en flux après marquage à l'iodure de propidium et annexine V-FITC. L'analyse est effectuée dans une fenêtre définie comme contenant les lymphocytes apparemment viables selon les paramètres de tailles et granulosités. Les résultats sont représentés en % de cellules viables. Moyennes de 2 expérimentations indépendantes.

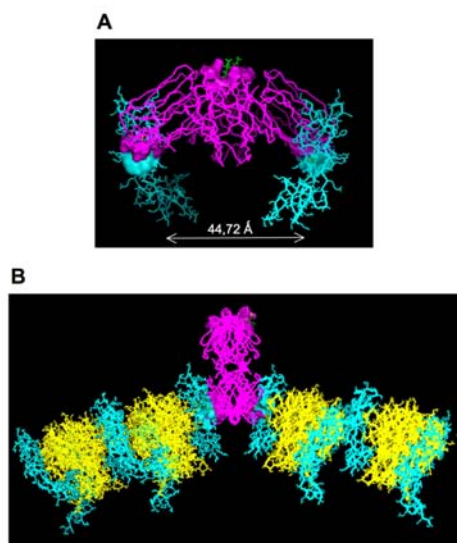
### III-1-2-2-5 Modélisation des interactions potentielles entre Morniga G et DR5 :

Il a été montré que la O-glycosylation contrôle la sensibilité des cellules tumorales au ligand Apo2L/TRAIL [6]. De plus, plusieurs sites potentiels de O-glycosylation de la partie extracellulaire du récepteur DR5 ont été identifiés. Ces sites sont les sérines 74, 75, 77 et les thréonines 130, 131, 132, 135 et 143 (Fig. 29A). L'accessibilité des sites potentiels de O-glycosylation de DR5 par la lectine a été étudiée par modélisation moléculaire en tenant compte de l'orientation des chaînes latérales des acides aminés potentiellement O-glycosylés et de l'organisation trimérique de DR5 avec ou sans ligand. En ne tenant en compte que les sites orientés vers l'extérieur du trimère physiologique (74, 75, 77 et 130, 131, 132), une modélisation de l'interaction de MorG sur le récepteur DR5 complexé avec son ligand naturel a été réalisée (Fig. 29C, 29D). Ces 6 positions permettent la liaison de la lectine. Comme MorG possède 4 sites de reconnaissance glycanique, on peut se demander si la lectine est

capable de mimer le ligand naturel TRAIL, c'est-à-dire si elle est capable de trimériser elle-même le récepteur DR5. Par conséquent, la structure cristallographique monomérique du récepteur DR5 a été utilisée. Du fait de l'orientation opposée des cavités de reconnaissance glycanique (*Fig. 29B*), seule une dimérisation du récepteur semble possible (*Fig. 30A*), les 2 autres sites du tétramère de lectine étant orientés vers l'extérieur de la surface cellulaire. Cependant, la multiplicité des sites glycaniques potentiels de DR5 (sites "superficiels" 74, 75, 77 et sites "moyens" 130, 131, 132) peut ouvrir la possibilité de la formation d'agrégats de monomères DR5 par la lectine, à la surface des cellules. De plus, comme avec le monomère DR5 libre, la lectine pourrait également favoriser le rapprochement de complexe trimérique TRAIL/DR5 (*Fig. 30B*), et donc faciliter la signalisation induite par le ligand naturel. Dans des conditions physiologiques, il est également possible de trouver le récepteur DR5 déjà préformé, c'est-à-dire trimérisé sans son ligand TRAIL [320]. Finalement, MorG pourrait former des agrégats de récepteur DR5, monomérique ou trimérique, permettant le déclenchement de la signalisation apoptotique.



**Figure 29 :** Interaction de Morniga G sur le récepteur DR5. (A) Carte des sites de O-glycosylation de la structure cristallographique du complexe trimérique TRAIL (en vert) /DR5 (en bleu) [6]. Les sérines 74, 75, 77 et thréonines 130, 131, 132, 135, 143 sont représentées en sphères rouges. (B) Modèle tridimensionnel de MorG (tétramère, MW ~ 72KDa) obtenue par modélisation moléculaire par homologie avec la MPA (Maclura pomifera agglutinin). Représentation de surface des cavités de reconnaissance glycanique avec 2 antigènes Tn (vert) pour a et b. (C) Modélisation de l'interaction de MorG (en violet) sur le récepteur DR5 (en bleu) complexé avec son ligand naturel TRAIL (en jaune) au niveau de l'antigène Tn positionné sur la sérine 75. (D) Zoom du site d'interaction. L'antigène Tn est représenté sous forme de stick en vert.



**Figure 30 : Dimérisation et agrégation.** (A) Dimérisation du récepteur DR5 (monomère en bleu) par la lectine (en violet) grâce à l'interaction de celle-ci au niveau des antigènes Tn (en vert) positionnés sur les thréonines 131 des deux monomères. (B) Formation d'agrégats de récepteurs DR5 (en bleu) complexés avec leurs ligands TRAIL (en jaune) par la lectine (en violet) grâce à l'interaction de celle-ci au niveau des antigènes Tn positionnés sur les thréonines 130.

### III-1-2-3 Discussion de l'article 2 :

Après avoir interagit avec les glycoconjugués des cellules cibles, MorG peut déclencher des signalisations intracellulaires conduisant à l'activation et à la mort des lymphocytes. A faible dose (5 à 10  $\mu\text{g/ml}$ ), MorG est capable d'activer des PBMC prélevées chez des individus sains, et notamment les populations lymphocytaires T et NK. En revanche, à la différence de MorM, MorG est capable d'activer également les lymphocytes B. A plus forte dose (20  $\mu\text{g/ml}$ ), comme MorM, MorG induit une perte de viabilité cellulaire de PBMC activées, et plus particulièrement de lymphocytes T activés, et des lymphocytes T leucémiques Jurkat. Cependant, en ce qui concerne les lymphocytes T leucémiques, tandis que la toxicité de MorM induite en 24 h nécessite l'absence de SVF, MorG induit leur mort en présence de SVF, suggérant que MorG est plus toxique sur cette lignée tumorale. Les différences d'effets biologiques entre MorM et MorG peuvent être dûs, en partie, à leur différence de spécificité de reconnaissance glycanique : la *N*-glycosylation pour MorM et la *O*-glycosylation pour MorG. Certaines molécules impliquées dans l'activation des lymphocytes ne possèdent que des sites de *N*-glycosylation (par exemple, les CD3, CD4, CD28 et CD45RO), d'autres présentent à la fois des sites de *O*- et de *N*-glycosylation (par

exemple CD7 et CD8) (*Tab. 7*). La même remarque peut être faite avec les récepteurs de mort, qui sont classiquement impliqués dans le contrôle négatif de l'activation lymphocytaire (AICD) [316] ou dans l'élimination des cellules cancéreuses [321]: DR5 serait uniquement *O*-glycosylé tandis que Fas serait seulement *N*-glycosylé (*Tab. 7*).

Après avoir évalué l'expression des antigènes Tn à la surface des cellules, il apparaît que l'activité cytotoxique de MorG est dépendante du niveau d'expression de ces antigènes. En effet, alors que les lymphocytes T CD3 naïfs, qui n'expriment pas l'antigène Tn, sont résistants à la cytotoxicité induite par MorG, les lymphocytes T activés et les cellules Jurkat, qui expriment l'antigène Tn à leur surface, sont sensibles à la cytotoxicité induite par MorG. Les lymphocytes T activés expriment un niveau intermédiaire d'antigène Tn qui résulte en une cytotoxicité intermédiaire de la lectine. Donc, MorG pourrait être un nouvel outil thérapeutique pour le traitement des lymphocytes pathologiquement actifs et/ou leucémiques lorsque ceux-ci surexpriment l'antigène Tn. En revanche, l'ensemble des expériences de toxicité réalisées avec Jurkat montre qu'il y a toujours une population résistante (environ 30% des cellules) à la mort induite par MorG. Cette résistance ne s'explique pas par le fait que certaines cellules échapperaient à l'interaction avec la lectine car les expériences de cytométrie en flux montrent une seule population homogène marquée par la lectine. Il serait intéressant de déterminer les mécanismes de résistance de ces cellules (déficience en caspases, expression de molécules anti-apoptiques...).

Les expériences d'analyse, par microscopie optique et cytofluorimétrie, de la cytotoxicité de la lectine sur les cellules Jurkat mettent en évidence la présence de différents types de morts cellulaires, avec une dominante apoptotique. La lectine pourrait ainsi induire différents mécanismes de mort, comme cela a été observé avec la Concanavaleine A, qui peut induire une mort par apoptose ou par autophagie [131,136]. Le phénomène d'apoptose peut s'expliquer de diverses manières. Le contact des cellules leucémiques avec MorG déclenche l'activation de la caspase-8 (dépendante des récepteurs de mort) intervenant au niveau de la voie extrinsèque et intrinsèque, mais aussi de la caspase-9 intervenant au niveau de la voie intrinsèque mitochondriale, les 2 voies convergeant pour activer la caspase-3. L'activation de cette dernière participerait au clivage de PARP. De plus, les cellules présentent une accumulation de céramides qui sont des sphingolipides pro-apoptotiques considérés comme des amplificateurs potentiels de la signalisation apoptotique des récepteurs de mort, tels que Fas et TNF-R1 [319].

Les résultats indiquent une implication prédominante des récepteurs de mort FADD-dépendants dans l'apoptose des cellules leucémiques Jurkat induite par MorG. L'absence des

capases-8 et -10 ou de la protéine FADD, qui joue un rôle indispensable dans la transmission du signal apoptotique entre les récepteurs de mort et les caspases initiatrices -8 et -10, permet l'échappement des cellules à la mort induite par MorG. Le même résultat est obtenu en absence de la caspase-9, ce qui est un argument de plus en faveur d'une mort apoptotique. Parmi les récepteurs de mort FADD-dépendant présents à la surface des cellules Jurkat, seul le récepteur DR5 possède des sites de *O*-glycosylation, et constitue donc une cible potentielle pour la lectine. Les expériences de neutralisation du récepteur DR5 ou de son ligand naturel TRAIL ont permis de mettre en évidence une résistance partielle des cellules à la mort induite par MorG. Ce résultat suggère (1) que la cytotoxicité de la lectine serait médiée en partie par son interaction avec le récepteur DR5, (2) que l'interaction de MorG sur les cellules leucémiques peut entraîner une sécrétion de TRAIL qui, dans un second temps, peut se lier sur son récepteur DR5.

Pour vérifier l'implication du récepteur DR5, il serait intéressant de démontrer la réalité de l'interaction de MorG avec le récepteur. L'utilisation de siRNA dirigés contre le récepteur DR5 pourrait apporter un premier élément de réponse car après avoir vérifié le « silencing » de DR5, si les cellules résistent à la mort induite par MorG cela renforcerait l'idée que le récepteur DR5 est impliqué. La modélisation moléculaire prédictive a permis de démontrer la possibilité d'interaction de la lectine sur le récepteur DR5 au niveau de plusieurs sites glycaniques potentiels (sites "superficiels" 74, 75, 77 et sites "moyens" 130, 131, 132). De plus, l'orientation des cavités de reconnaissance glycanique de la lectine suggère qu'elle serait capable de dimériser le récepteur et/ou de former des agrégats de monomères ou de trimères de DR5, avec ou sans ligand. L'agrégation des récepteurs de mort est une étape essentielle au déclenchement de la signalisation. Des expériences d'immunoprécipitation de la lectine et du récepteur DR5 sont en cours de réalisation dans le but de vérifier la présence de la lectine dans la fraction contenant le récepteur.

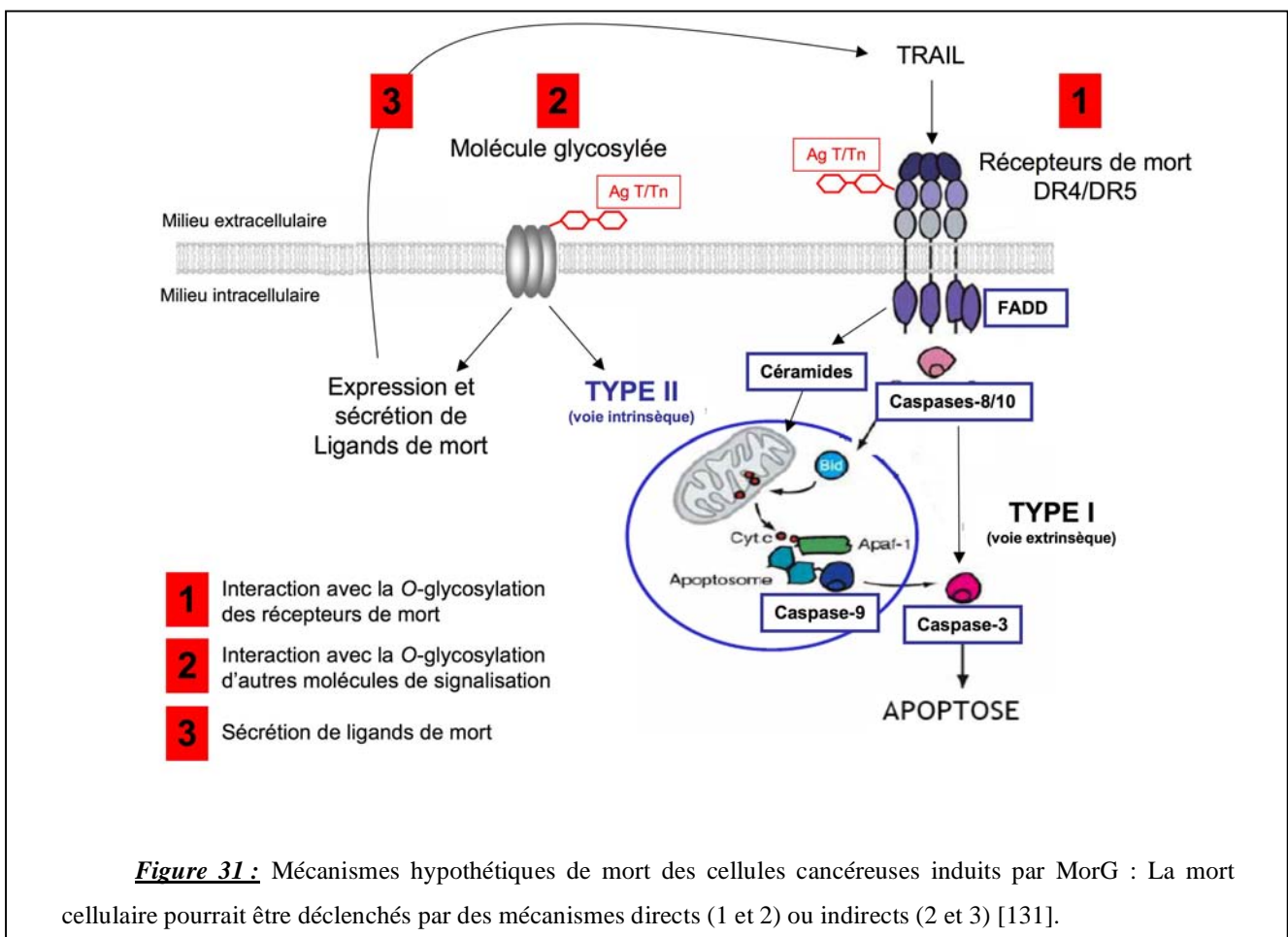
En ce qui concerne l'induction de la sécrétion de TRAIL sous l'effet de la lectine, la réalisation de dosages ELISA permettrait de vérifier l'hypothèse. Ce phénomène pourrait être déclenché par l'interaction de la lectine avec des glycoprotéines possédant des sites de *O*-glycosylation et connues pour être impliquées dans la modulation de l'activation, mais aussi de la mort lymphocytaire. C'est le cas de CD7 ou CD45 qui sont connus pour leur propriété modulatrice de la mort [34,174] et de l'activation cellulaire [173].

Pour que MorG vienne interagir efficacement avec les cellules leucémiques Jurkat, que ce soit sur le récepteur DR5 ou une autre molécule, il faut que les cellules soient *O*-glycosylées. En effet, l'utilisation de benzyl-GalNac comme inhibiteur de la *O*-glycosylation



a entraîné une diminution de la réactivité et de la cytotoxicité de MorG sur les cellules. Cependant cette résistance n'est pas totale. Il est sans doute nécessaire d'inhiber plus intensément la *O*-glycosylation pour potentialiser cette résistance. Par conséquent il serait intéressant d'utiliser des siRNA dirigés contre la GalNAc-transférase qui catalyse le transfert de la N-acétyl-galactosamine sur une sérine ou une thréonine (antigène Tn). Il serait également intéressant de tenter d'inhiber la cytotoxicité de MorG par addition de sucres (galactose, N acétyl-galactosamine, antigène Tn) ou de protéines *O*-glycosylées (Mucines).

En conclusion, les mécanismes possibles de la mort des cellules leucémiques induite par MorG peuvent être déclenchés par une interaction avec (1) des récepteurs de mort *O*-glycosylés tels que DR5, (2) des molécules *O*-glycosylées de la surface cellulaire (comme CD45 [15]) qui peuvent activer la voie intrinsèque de la mort cellulaire apoptotique, (3) des molécules activatrices *O*-glycosylées (telles que CD45) qui peuvent induire la production de ligands de mort (FasL, Apo2L/Trail, TNF) qui, a leur tour, vont se lier sur leur récepteur de mort respectif (Fig. 31).



### **III-1-3 Discussion générale des articles 1 et 2 :**

Ces résultats illustrent le fait que des lectines de structure tridimensionnelle proche (MorM et Artocarpine) et dont la spécificité monosaccharidique est identique peuvent entraîner des effets biologiques différents. L'Arto est activatrice des lymphocytes T et non toxique alors que MorM est activatrice et toxique pour les lymphocytes T (article 1).

Alors que MorM et Arto sont deux mannose-JRLs capables d'activer *in vitro* des PBMC d'individus sains, et plus particulièrement les lymphocytes T (respectivement 45 et 25 %) et NK (3 % pour les deux lectines), elles n'ont pas la même capacité à induire une toxicité sur ces cellules. Cette observation a été attribuée au fait que MorM possède une cavité de reconnaissance glycanique plus large que son homologue Arto, se traduisant par un nombre probablement plus élevé de cibles glycaniques potentielles à la surface des cellules. Par conséquent, les résultats montrent une endocytose plus marquée pour MorM et suggèrent qu'un plus grand nombre de voies de signalisation peuvent être potentiellement activées, notamment les voies de signalisation participant à l'activation lymphocytaire et à la mort cellulaire. Contrairement à MorM qui induit jusqu'à 80 % de toxicité sur des PBMC activés, Arto n'induit aucune toxicité. Ainsi, alors que ces deux lectines possèdent une spécificité monosaccharidique identique, leurs effets sur les cellules du système immunitaire sont différents : Arto présente un effet immunopotentialisateur et MorM un effet activateur et immunosuppresseur.

L'activation par MorM semble être un phénomène précoce (3 h) alors que l'induction de la toxicité est plus tardive (24 h), et nécessite l'activation préalable. De plus, des lectines de structure tridimensionnelle proche mais dont la spécificité monosaccharidique est différente (MorM et MorG) peuvent entraîner l'activation et induire de la toxicité sur des lymphocytes (article 2). Ces résultats montrent que les lectines végétales peuvent avoir un comportement différent selon l'état physiologique des lymphocytes. Cette différence peut être directement corrélée à la qualité de la glycosylation des molécules exprimées à la surface des cellules. En effet, de nombreux travaux montrent que la qualité de la glycosylation des molécules de surface module l'activation lymphocytaire [37,322]. De plus, la sensibilité des lymphocytes T activés à la toxicité induite par MorM et MorG pourrait être dépendante des modifications de la *N*-glycosylation pour MorM et des modifications de la *O*-glycosylation pour MorG.

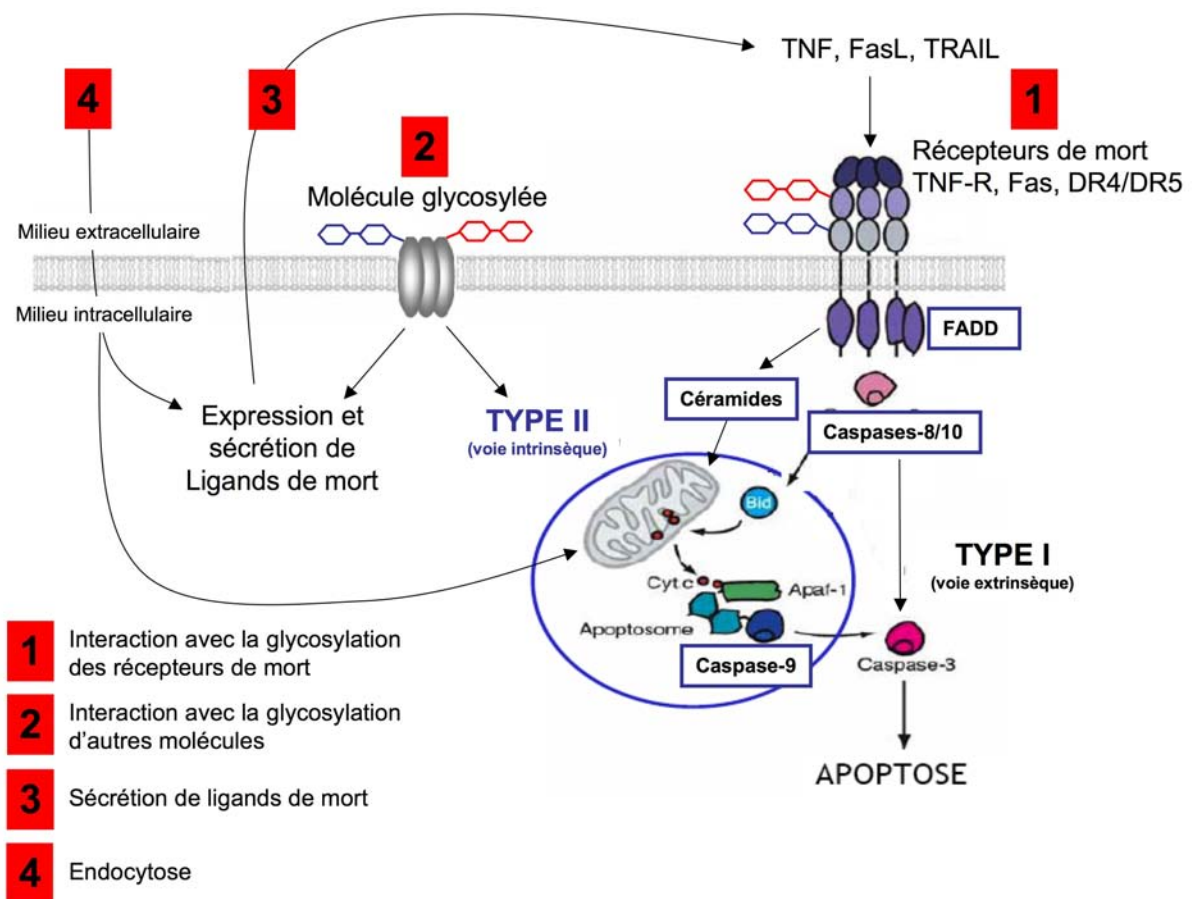
Par ailleurs, contrairement à MorM, MorG, une galactose-JRL, a la capacité non seulement d'activer les lymphocytes T et NK (respectivement de 45 et 3 %) mais également

les lymphocytes B (20 %). Par conséquent, une question se pose par rapport à la qualité de la glycosylation entre lymphocytes T et B. De plus, ces deux lectines du mûrier noir présentent un effet toxique sur les lymphocytes leucémiques de type Jurkat à 20 µg/ml. MorG semble être beaucoup plus toxique que MorM dans ce modèle cellulaire : 60 % de toxicité après 24 h de contact avec MorG et 30 % de toxicité après 24 h de contact avec MorM. Cependant, la toxicité de MorM peut être augmentée jusqu'à 60 % en déprivant le milieu de culture en SVF. En revanche, dans les deux cas, une signalisation apoptotique faisant intervenir les récepteurs de mort FADD-dépendants et les caspases semble être impliquée. Deux hypothèses sont à envisager en ce qui concerne l'induction de l'apoptose par ces lectines : un effet direct ou un effet indirect sur les récepteurs de mort. Elles peuvent interagir soit avec des récepteurs de mort glycosylés tels que Fas, TNF-R1 et DR5 soit avec d'autres molécules membranaires glycosylées impliquées dans l'activation d'une signalisation apoptotique et/ou dans la sécrétion de ligands de mort. En ce qui concerne l'action directe sur les récepteurs de mort, ces deux lectines n'auraient pas les mêmes cibles. En effet, alors que le DR5 est uniquement *O*-glycosylé, les récepteurs Fas et TNF-R1 sont uniquement *N*-glycosylés (*Tab. 7*). Ainsi, MorM et MorG activeraient les mêmes voies de signalisation conduisant à l'apoptose sans pour autant interagir avec les mêmes molécules de surface. En ce qui concerne l'effet indirect, les molécules ciblées par ces lectines peuvent être différentes (dans ce cas la molécule est uniquement *N*-glycosylée ou *O*-glycosylée) ou identiques (dans ce cas les molécules ciblées sont *O*- et *N*-glycosylées).

Pour conclure, dans nos conditions expérimentales, Arto est immunopotentialisatrice (aucun effet toxique), MorM et MorG sont potentiellement activatrices sur les lymphocytes au repos et immunosuppressives sur les lymphocytes T activés (*Tab. 8*). MorG possède un effet cytotoxique plus élevé sur les lymphocytes T leucémiques, comparativement à MorM. De façon intéressante, les deux lectines du mûrier noir induisent une signalisation cytotoxique dépendante des récepteurs de mort FADD-dépendants. MorM ciblerait les voies de signalisations dépendante de récepteurs de mort *N*-glycosylés tels que Fas et TNF-R1, alors que MorG ciblerait les récepteurs de mort *O*-glycosylés tels que le DR5. Les mécanismes hypothétiques de mort cellulaire induits par ces deux lectines peuvent être initiés (1) par l'interaction des lectines avec la glycosylation de récepteurs de mort, (2) par la fixation des lectines au niveau de la glycosylation d'autres molécules membranaires glycosylées, qui déclenche l'apoptose et/ou la sécrétion de ligands de mort, et (3) par l'endocytose des lectines qui peut entraîner l'activation de voies de signalisation conduisant à l'apoptose et/ou à la sécrétion de ligands de mort (*Fig. 33*).

Lectine	Spécificité de reconnaissance monosaccharidique	ACTIVATION				MORT CELLULAIRE		
		PBMC	Lymphocytes T	Lymphocytes B	Cellules NK	PBMC activés	Lymphocytes T activés	Cellules Jurkat
Con A	Mannose/Glucose	+++	++	+/-	+	ND	ND	+/-
Arto	Mannose	+	+	+/-	+	0	0	-
MorM	Mannose	++	++	0	+	++	+++	+
MorG	Galactose	++	++	++	+	++	ND	+++

**Tableau 8 :** Récapitulatif des effets biologiques des lectines végétales étudiées : Concanavoline A (ConA), Artocarpine (Arto), Morniga M (MorM) et Morniga G (MorG).



**Figure 33 :** Mécanismes hypothétiques induits par les JRL du mûrier noir. MorG interagirait avec la O-glycosylation (Rouge) et MorM avec la N-glycosylation (Bleu) de glycoconjugués membranaires (1, 2 et 4), conduisant à la mort cellulaire des lymphocytes activés [117].

## **III-2 Utilisation des lectines végétales comme vecteur de molécules anticancéreuses**

Certains glycoconjugués, préférentiellement exprimés par les cellules tumorales, représentent des cibles potentielles dans le cadre du traitement anticancéreux afin d'améliorer l'efficacité des médicaments. Les lectines végétales sont des protéines dont la fonction primaire est de reconnaître et d'interagir spécifiquement avec la partie glycanique des glycoconjugués. Certaines lectines végétales, comme MorG, interagissent spécifiquement avec des antigènes glycaniques associés aux tumeurs (ou TACA), tels que les antigènes T (CD176 ; Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ 1-Ser/Thr) et Tn (CD175 ; GalNAc $\alpha$ 1-Ser/Thr) [177], et sont rapidement endocytées par les cellules cibles [323]. Il est donc envisageable d'utiliser MorG comme vecteur de molécules anticancéreuses, puisqu'elle permettrait de cibler les cellules tumorales T/Tn positives et d'assurer une délivrance intracellulaire des molécules anticancéreuses.

Pour évaluer la faisabilité et l'intérêt d'utiliser MorG dans le ciblage de tumeurs, nous avons choisi d'étudier la vectorisation de molécules employables en photochimiothérapie (PCT). La PCT est pratiquée pour le traitement de tumeurs solides (PDT ou thérapie photodynamique) [188,189] ou de pathologies hématologiques impliquant les lymphocytes T (ECP ou photochimiothérapie extracorporelle) [190,191,194]. Cette technique est basée sur l'activité de molécules photosensibles (ou photosensibilisants) qui après photo-activation deviennent toxiques pour les cellules cibles. Comme la plupart des thérapeutiques anticancéreuses, ce traitement souffre d'un manque de sélectivité et de biodisponibilité des molécules vis-à-vis des cellules tumorales.

### ***III-2-1 Ciblage de porphyrine pour le traitement PCT***

#### **III-2-1-1 Introduction des articles 3 et 4 :**

Comme la plupart des agents anticancéreux, les PS souffrent d'un manque de sélectivité et de biodisponibilité vis-à-vis des cellules cancéreuses. En effet, il a été montré, chez des souris Nude xéno greffées par des tumeurs sous-cutanées, que le Photofrin s'accumule dans de nombreux organes tels que le foie, la vessie, la rate, la peau, les muscles 7,5 h après administration *i.p.* [324]. Pour le moment, la sélectivité de la PDT anticancéreuse

repose surtout sur la localisation de l'irradiation. Grâce à l'endoscopie, il est possible de localiser précisément le faisceau lumineux du laser. Ainsi, le ciblage des PS pourrait, en augmentant la quantité de PS disponible dans le tissu cible, améliorer l'efficacité de la PCT et élargir ses applications.

De nombreuses cellules tumorales sont caractérisées par des altérations de la glycosylation et en particulier des glycoprotéines membranaires. Un phénomène récurrent est la synthèse incomplète des *O*-glycanes, qui résulte en une expression d'antigènes glycaniques associés aux tumeurs (TACA), tels que les antigènes T et Tn [40]. Ces TACAs ont été associés à divers cancers et en particulier à des cancers épithéliaux [47,48,49] et à des leucémies [50]. Ils représentent donc des candidats très attractifs pour le ciblage de médicaments dans le traitement de ces pathologies.

En raison de leur capacité à interagir spécifiquement avec certains TACAs, les lectines végétales sont des candidats intéressants pour le ciblage des cellules tumorales. Ainsi, MorG, une lectine végétale décrite comme étant spécifique des antigènes T et Tn, peut être proposée comme molécule vectrice vis-à-vis de ces TACAs [177].

Comme la spécificité de reconnaissance de MorG vis-à-vis des antigènes T et Tn n'a été évaluée que par des approches biochimiques acellulaires, nous avons, dans un premier temps (Article 3), vérifié la spécificité glycanique et la capacité d'endocytose de MorG dans un contexte cellulaire. La lignée cellulaire leucémique Jurkat a été utilisée comme modèle de cellules cancéreuses Tn positives [59]. Ensuite, des conjugués associant de façon covalente la porphyrine TrMPyP à la lectine MorG ont été préparés et caractérisés. Leur endocytose et leur phototoxicité ont été évaluées sur le modèle cellulaire leucémique Jurkat.

Puis (Article 4), l'efficacité de ciblage du conjugué TrMPyP-MorG a été évaluée comparativement sur des lymphocytes sains et tumoraux, sur des mélanges de cellules pathologiques et saines, mais aussi sur différents types de leucémies, c'est-à-dire sur des lignées leucémiques lymphoïdes et myéloïdes et sur des cellules fraîches de patients atteints de leucémie lymphoïde aigue ou chronique. Enfin, les mécanismes de la signalisation phototoxique induits par le conjugué ont été étudiés.

**III-2-1-2 Article 3 : Morniga G : a plant lectin as an endocytic ligand for photosensitizer molecule targeting towards tumor-associated T/Tn antigens**





## Morniga G: A Plant Lectin as an Endocytic Ligand for Photosensitizer Molecule Targeting Toward Tumor-Associated T/Tn Antigens

Guillaume Poiroux<sup>1,2</sup>, Marguerite Pitié<sup>3†</sup>, Raphaël Culerrier<sup>2†</sup>, Bruno Ségui<sup>1</sup>, Els J.M. Van Damme<sup>4</sup>, Willy J. Peumans<sup>4</sup>, Jean Bernadou<sup>3</sup>, Thierry Levade<sup>1</sup>, Pierre Rougé<sup>2</sup>, Annick Barre<sup>2</sup> and Hervé Benoist<sup>\*1</sup>

<sup>1</sup>INSERM U.858 I2MR, Institut Louis Bugnard, Toulouse Cedex, France

<sup>2</sup>UMR UPS-CNRS 5546, Université de Toulouse, Castanet-Tolosan, France

<sup>3</sup>CNRS, LCC (Laboratoire de Chimie de Coordination), Toulouse, France

<sup>4</sup>Laboratory of Biochemistry and Glycobiology, Department of Molecular Biotechnology, Ghent University, Ghent, Belgium

Received 30 August 2010, accepted 4 November 2010, DOI: 10.1111/j.1751-1097.2010.00858.x

### ABSTRACT

Porphyryns are used as photosensitizer (PS) in photodynamic therapy in cancer treatment. Nevertheless, the development of photochemotherapy in oncology remains limited, because of the low selectivity of PSs. In order to allow PS targeting toward tumor-associated antigens, for the first time a white-light activatable porphyrin, [5-(4-(5-carboxy-1-butoxy)-phenyl)-10,15,20-tris(4-*N*-methyl-pyridiniumyl)-porphyrin] (TrMPyP) was covalently linked to Morniga G (MorG), a galactose-specific binding plant lectin, known to recognize with high-affinity tumor-associated T/Tn antigen in cell-free systems. Firstly, using fluorescein-labeled MorG, the sugar-dependent binding and uptake of lectin by Tn-positive (Jurkat lymphoid leukemia) cells was demonstrated. Secondly, the TrMPyP–MorG conjugate was molecularly characterized. Cytometric and confocal microscopic analysis demonstrated that PS covalent linking to MorG preserved sugar-dependent specific binding and uptake of lectin by Jurkat leukemia lymphocytes. Thirdly, the conjugate (with a 1:1 PS:lectin ratio) that was bound and quickly (5 min) taken-up, induced greater than 90% cytotoxicity upon irradiation at 10 nM concentration, whereas the free PS was absolutely nontoxic. On the contrary, normal lymphocytes strongly resisted to the conjugate-mediated phototoxicity. Thus, owing to their binding and endocytosis capacities, plant lectins represent promising molecules for targeting of tumor glycan alteration and to enhance the efficiency of specific delivery of PSs to tumor cells.

### INTRODUCTION

Plant lectins are proteins that specifically recognize and bind sugars and can distinguish subtle alterations in glycans (1,2). They display multiple biological effects when injected into mammals, such as antitumor properties. For instance, low doses of ConA, a legume lectin, can activate intra-hepatic NK and NKT lymphocytes, and induce antimetastatic effects in liver (3). Also, ConA triggers cell death of p53-negative tumor

cells (4). Several lectins are known to be easily taken-up by cells and could be useful for intra-cellular delivery of drugs (5).

Photodynamic therapy (PDT) uses nontoxic photosensitizer (PS) agents, such as porphyrin, oxygen and visible light to kill solid tumors (6). PDT is recognized in various countries as a potential treatment of different cancers, *e.g.* tumors from lung or gastrointestinal tract, but also skin tumors and metastases. To treat noncutaneous tumors, PDT is combined to endoscopy technology. Alternatively, after cytopheresis, extracorporeal photochemotherapy (ECP), which is based on the activation of a PS (*i.e.* psoralen) by ultraviolet-A (320–400 nm) radiation, is applied on peripheral blood mononuclear cells (PBMC) to kill circulating malignant cells (7). Both photochemotherapy methods may be used to decrease the tumor mass and, in contrast to surgery, radiotherapy and chemotherapy, to stimulate anticancer immunity (8). In addition, photochemotherapy can be effective against chemo- and radio-resistant tumors (9).

The relative poor selectivity for tumor tissue represents a major drawback for the development of photochemotherapeutic applications. For instance, therapeutic selectivity of PDT is achieved from the relative preferential localization of PS in tumor tissue, owing to its physicochemical properties (*e.g.* hydrophobicity) and from the control of irradiated areas (*e.g.* in dermatologic application). However, in complex anatomical sites, such as the thoracic or abdominal cavities, confined irradiation is more difficult and treatment may destroy normal tissue. Consequently, targeting of PS by increasing drug concentration in tumor tissues must be sought to enhance photochemotherapy efficacy and to broaden its clinical applications. Several strategies for targeted PS delivery have been proposed such as the preparation of PS conjugates with antibodies, EGF or adenoviral proteins (10–12). In the same way, plant lectins could be used as a carrier to PS targeting. In this case, the rationale for drug targeting toward tumor cells using plant lectins is the existence of frequent alterations of protein and lipid glycosylation at the tumor cell surface. For instance, numerous solid and hematopoietic tumors are aberrantly O-glycosylated, because of impaired O-glycan biosynthesis. Thus, tumors overexpress glycotopes such as T (CD176) (Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ 1-O-Ser/Thr) or Tn (CD175) (GalNAc $\alpha$ 1-O-Ser/Thr) antigens (13,14).

†Marguerite Pitié and Raphaël Culerrier contributed equally to this work.

\*Corresponding author email: herve.benoist@inserm.fr (Hervé Benoist)

© 2010 The Authors

Photochemistry and Photobiology © 2010 The American Society of Photobiology 0031-8655/11

Few observations have demonstrated that some PS can interact with plant lectins (*e.g.* jacalin [15] and some legume lectins [16,17]), with various oligomeric stacking arrangements, preserving the sugar-binding specificity of lectins (15–17). Hence, these noncovalent conjugates could be candidates for increasing PDT efficiency (15–17). However, to our knowledge, no experiment has demonstrated the toxic effect of such conjugates. They may be not stable enough to trigger cytotoxicity. Obviously, the covalent linking of PS with the lectins, without alteration of their carbohydrate-binding cavity, would increase conjugate stability.

Galactose-binding lectins have sugar binding patterns that are considerably different from one to another. Thus, the Jacalin-related lectin (JRL) family comprises galactose-specific binding lectins, which share the basic ability to bind galactose but probably differ in their capacity to react with complex glycans, such as O-glycans. For instance, Morniga G (MorG), a two-chain tetrameric ( $\alpha\beta\beta_4$ ) lectin from *Morus nigra*, is a galactose-specific binding JRL described as T/Tn antigen-specific in cell-free systems (18). The purpose of the present study was to: (1) investigate the binding and the uptake of MorG by Tn-positive tumor cells; (2) conjugate covalently a plant lectin (MorG) to a porphyrin (TrMPyP), a cationic and hydrophilic porphyrin known to be white-light activatable (19); and (3) test the ability of such a conjugate to increase PS phototoxicity and targeting.

## MATERIALS AND METHODS

**Cells and reagents.** Jurkat T leukemia cells were cultured in RPMI containing 10% FCS. PBMC from healthy subjects were separated using Ficoll-Paque Plus (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) density gradient (20), then T lymphocytes were isolated using the Rosette Sep human T cell enrichment cocktail (StemCell Technologies, Grenoble, France) (20).

Morniga G was purified from the bark of black mulberry tree (*M. nigra*) and labeled with FITC (Acros Organics, Fisher Scientific, Illkirch, France) as previously described (20). Anti-CD175 (anti-Tn) and PE-anti-CD3 mAbs were from Acris Antibodies GmbH (Herford, Germany) and BD Biosciences (Le Pont-de-Claix, France), respectively.

**Preparation and characterization of TrMPyP–MorG conjugates.** TrMPyP [5-(4-(5-carboxy-1-butoxy-phenyl)-10,15,20-tris(4-*N*-methylpyridiniumyl)-porphyrin)] was synthesized and its NHS activated ester was prepared as described previously (21) (structure in Fig. 3), then purified by  $\text{CHCl}_3$  precipitation and dissolved in DMSO.

Morniga G (1 mg mL<sup>-1</sup> in borate buffer 50 mM pH 8.2 containing 50 mM D-galactose) and purified NHS activated TrMPyP (30 mg mL<sup>-1</sup>) were mixed 24 h at 37°C in the dark, to obtain 10, 30, 100 and 200 TrMPyP/MorG ratios. Conjugates were purified by extensive dialysis against buffer.

The constituent concentrations in the conjugates and hence the substitution ratios were determined by absorbance spectroscopy. Protein amount was quantified using the micro BCA assay (Pierce, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL). The extinction coefficient of the conjugate was estimated from the UV absorption spectra at the Soret band of TrMPyP as 200 000 cm<sup>-1</sup>M<sup>-1</sup> at 434 nm.

Bioconjugates were analyzed by SDS-PAGE, or by mass spectrometry using a Voyager-DE PRO MALDI-TOF mass spectrometer (Applied Biosystems Inc., Framingham, MA) operated in the reflectron (delayed extraction) and linear mode. A solution of sinapinnic acid in acetonitrile and TFA (30%/0.1%) was used as matrix. Samples were prepared by mixing them with the matrix at a sample:matrix ratio 1:1. The mixture was spotted onto a MALDI plate and allowed to dry.

**Analysis of Morniga G binding to and uptake by cells.** Cells (10<sup>6</sup> mL<sup>-1</sup>) were incubated with FITC–MorG or TrMPyP–MorG at 4°C or 37°C, with or without Glucose, Mannose, Galactose, *N*-acetyl- $\alpha$ -D-galactosamine, Mannan, Lactoferrin, Bovin Submaxillary

Mucin (Sigma–Aldrich, L’Isle d’Abeau Chesnes, France) and Tn antigen (Dextra Laboratories, Reading, UK), washed and analyzed by flow cytometry. FITC–MorG and TrMPyP–MorG cell stainings were analyzed on FACS Calibur and LSRII cytometers (Excitation: 405 nm; detection: 660 ± 20 nm) (BD Biosciences), respectively. For confocal microscopy, cells were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and images were acquired using a CLSM-SP2-equipped microscope (Leica, Mannheim, Germany). For the DAPI, FITC and TrMPyP, excitation light was 405, 488 and 458 nm and detection light was 410–470, 500–550 and 650–700 nm, respectively.

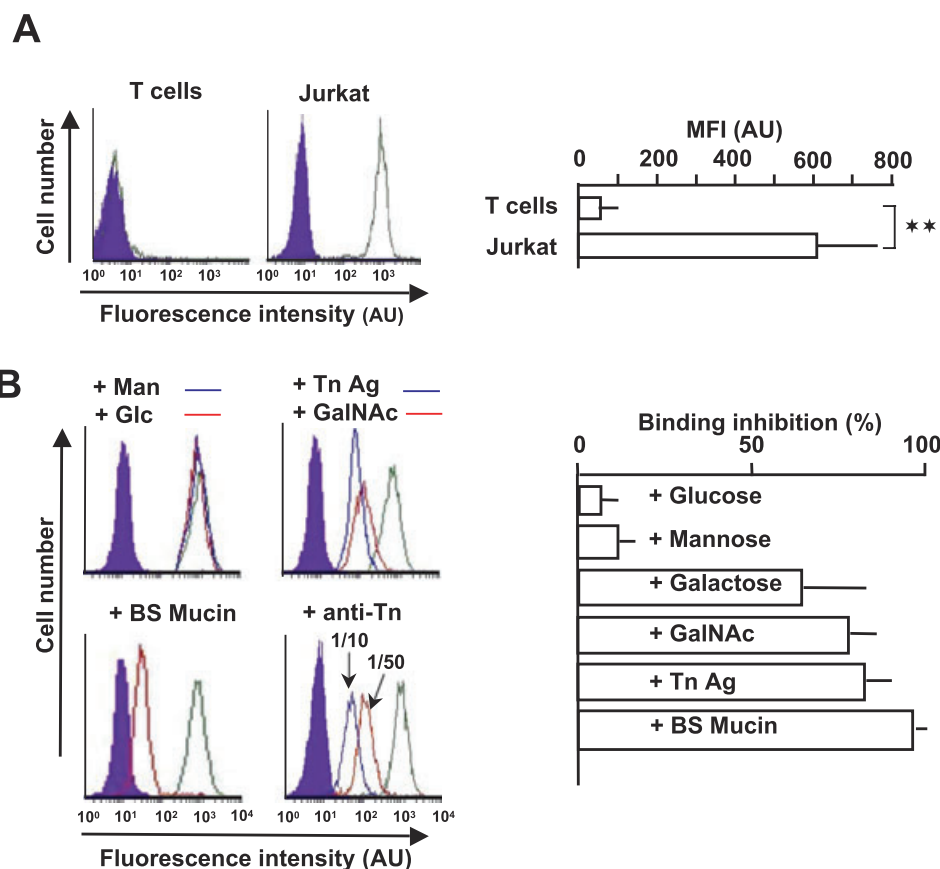
**Photodynamic treatment and cell death evaluation.** Cells (10<sup>6</sup> mL<sup>-1</sup>) were exposed in the dark to MorG, TrMPyP or TrMPyP–MorG, for 15 min at 37°C, then washed. Because TrMPyP is white-light activatable, cells were irradiated with a bank of four white fluorescent tubes (Philips master TL-D 18W/840) for 7.5 min (1.7 J cm<sup>-2</sup> light dose). Cell viability was evaluated using the MTT reduction method (Euromedex, Souffelweyersheim, France) or by flow cytometry after propidium iodide (AbCys, Paris, France) labeling, as previously described (20).

## RESULTS

### Morniga G binds to and is taken-up by a Tn-positive leukemia cell line

Because MorG has been described to specifically recognize high density polyvalent T/Tn glycoconjugates using acellular systems (18), we investigated its reactivity toward Jurkat cells known to be Tn-positive cells (13). Incubation (30 min at 4°C) of cells with FITC-labeled MorG resulted in a strong labeling of Jurkat T cells, much higher than that of human CD3<sup>+</sup> T lymphocytes (Fig. 1A). As expected, Jurkat T cells were strongly positive when stained with an anti-Tn (anti-CD175) mAb, whereas human peripheral T cells remained negative (data not shown). To investigate the saccharide recognition specificity of MorG in a cellular context, binding inhibitory experiments with different monosaccharides were conducted. Addition of 20 mM D-glucose or D-mannose resulted in a poor inhibition (about 10%) of MorG binding to Jurkat T cells, whereas D-galactose was a more potent inhibitor (about 65%) (Fig. 1B). Addition of 20 mM  $\alpha$ GalNAc (*N*-acetyl- $\alpha$ -D-galactosamine) or Tn antigen even more strongly reduced the binding of MorG (inhibition >75%). The use of 100 mM  $\alpha$ GalNAc or Tn antigen enhanced the level of MorG binding inhibition (binding inhibition: 96 ± 1% and 97 ± 1% respectively), while 100 mM D-glucose increased unspecific inhibition (16 ± 14%). Finally addition of 1  $\mu$ M Bovine Submaxillary Mucin, known as a glycoprotein containing high-density O-linked cryptic polyvalent T/Tn glycotopes (18), almost abrogated the MorG binding to Jurkat T cells (Fig. 1B). This finding indicates the importance of T/Tn antigen clusters in the recognition ability of MorG. On the contrary, Lactoferrin, a glycoprotein only *N*-glycosylated, did not inhibit MorG binding (data not shown). Finally, addition of anti-Tn mAb led to a dose-dependent inhibition of MorG binding, demonstrating that the lectin primarily interacts with Tn antigens on the leukemia cells (Fig. 1B, left).

To be effective as a drug-delivery system, MorG must be efficiently internalized into tumor cells. MorG uptake was monitored following incubation with FITC–MorG at 37°C. Cytometric analysis showed that FITC–MorG labeling of Jurkat cells increased in a time-dependent manner at 37°C, as compared to 4°C incubation where only binding occurred, suggesting that the lectin can be internalized as early as 5 min



**Figure 1.** Sugar specificity of Morniga G (MorG) binding to Tn-positive Jurkat cells. Binding of MorG to Tn-positive Jurkat cells was analyzed, using  $0.125 \mu\text{g mL}^{-1}$  FITC-labeled lectin. (A and B) Cell fluorescence was measured by flow cytometry. (A) After incubation for 30 min at  $4^\circ\text{C}$ , lectin binding on CD3-positive T lymphocytes (Tn-negative cells) in peripheral blood mononuclear cells from healthy donors and on Jurkat leukemic lymphocytes (Tn-positive cells) was analyzed. Left, representative analysis of cells incubated without (full histograms) or with (empty histograms) the lectin. Right, mean fluorescence intensity (MFI) of lectin-positive cells, expressed as arbitrary units (AU), means  $\pm$  SD ( $n = 4$ ). (B) Jurkat cells were incubated (30 min,  $4^\circ\text{C}$ ) in the presence of FITC-lectin with or without 20 mM of glucose (Glc), mannose (Man), galactose, *N*-acetyl- $\alpha$ -D-galactosamine (GalNAc), Tn antigen (Tn Ag),  $1 \text{mg mL}^{-1}$  of BS Mucin or anti-Tn monoclonal antibody (anti-Tn). Left, representative histograms (effect of galactose addition not shown); right, means  $\pm$  SD of three to five experiments.

(Fig. 2A). Even the addition of a moderate dose (20 mM) of a single sugar such as  $\alpha$ GalNAc strongly inhibited this phenomenon, showing that the internalization process clearly depends on carbohydrate specific recognition. Confocal microscopy analysis confirmed that MorG was internalized after 15 min incubation at  $37^\circ\text{C}$ , while this process was blocked at  $4^\circ\text{C}$  (Fig. 2B) or after addition of  $\alpha$ GalNAc (data not shown).

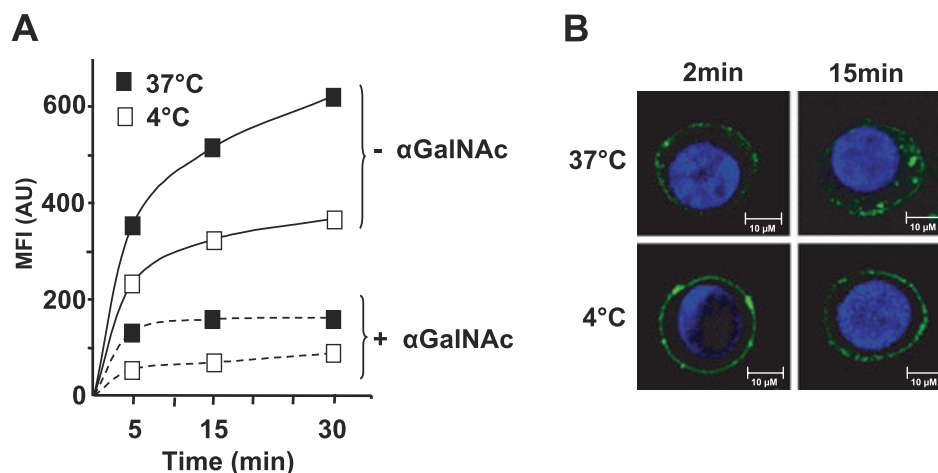
#### Molecular characterization of TrMPyP–MornigaG conjugates

Different conjugates were prepared using various porphyrin/MorG ratios. The coupling products were analyzed and compared with MorG. Using SDS-PAGE analysis, Coomassie blue staining demonstrated that, whereas MorG migrated as a single polypeptide of approximately 16 kDa corresponding to the mass of the protein  $\alpha$ -heavy chain [in fact corresponding to a mixture of glycopeptides with molecular mass of about 16 000 Da (22)], conjugates migrated as higher molecular weight complexes (Fig. 3A-a). As the ratio TrMPyP/MorG increased, the apparent mass of the conjugates increased, due to the association of a higher number of porphyrin molecules covalently linked to the heavy chain. In the absence of

Coomassie staining, conjugates appeared as yellow bands due to the presence of the porphyrin (Fig. 3A-b).

As expected (22), a MALDI-TOF mass spectrometry analysis showed that the lectin monomer is constituted of a  $\beta$ -light chain ( $\beta_1 = 2179$  Da) and a  $\alpha$ -heavy chain (corresponding to a mixture of at least three polypeptides with molecular mass of  $\alpha_1 = 15\,800$  Da;  $\alpha_2 = 15\,990$  Da and  $\alpha_3 = 16\,190$  Da, due to different glycosylation patterns of the protein) (Fig. 3B, upper panels). Analysis of the reaction mixture with 100 equivalents of TrMPyP revealed the presence of 0, 1 or 2 porphyrin molecules linked to the  $\beta$ -light chain of MorG, as demonstrated by the formation of  $\beta_1$  (2179 Da),  $\beta_2$  (2939 Da) and  $\beta_3$  (3699 Da) complexes, respectively. The presence of porphyrin linked to the  $\alpha$ -heavy chain further increased the complexity of the mixture and molecular masses ranging between 15 800 and 20 100 Da were observed, in accordance with a maximum of five TrMPyP per  $\alpha$ -heavy chain of MorG.

Analysis of the conjugate obtained using only 10 equivalents of TrMPyP per lectin indicated the presence of covalently linked TrMPyP, essentially observed on the heavy chain ( $\alpha_4$  and  $\alpha_5$ ) that appeared as a mixture of polypeptides around



**Figure 2.** Uptake of Morniga G (MorG) by Jurkat cells. The uptake of MorG by Tn-positive Jurkat cells was analyzed, using  $0.125 \mu\text{g mL}^{-1}$  FITC-labeled lectin. (A) Cell fluorescence was measured by flow cytometry. Mean fluorescence intensity (MFI) of Jurkat cells incubated with FITC-lectin for the indicated times, at  $4^\circ\text{C}$  and  $37^\circ\text{C}$ , with and without  $20 \text{ mM } \alpha\text{GalNAc}$ . Data are representative of two independent experiments. (B) Confocal microscopy of Jurkat cells incubated with FITC-lectin at  $37^\circ\text{C}$  or  $4^\circ\text{C}$ . Nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole.

17 kDa (Fig. 3B). There was no or little conjugate containing one porphyrin covalently linked to the light chain ( $\beta_2$  peak). In addition, lectin and porphyrin concentrations were determined by micro BCA protein assay as well as by spectrophotometry at 434 nm (*i.e.* the maximal absorbance of the Soret band of the porphyrin), respectively. Conjugates obtained with 10 TrMPyP equivalents appeared to contain a mean of 1 TrMPyP per MorG tetramer. Finally, because increasing porphyrin/MorG ratios from 10 to 200 equivalents of TrMPyP per lectin altered the specific hemagglutination activity of MorG (data not shown) and induced a spontaneous agglutination of some conjugates, the TrMPyP/MorG conjugate with a mean of 1 TrMPyP per MorG tetramer (prepared with 10 equivalents of porphyrin) was used in subsequent cellular experiments.

#### Cellular binding specificity, uptake and cytotoxicity of TrMPyP–MorG conjugates

Cellular interactions of the TrMPyP–MorG (equimolecular) conjugate were analyzed both by flow cytometry and confocal microscopy (Fig. 4A–B). Internalization of the conjugate occurred as early as 5 min at  $37^\circ\text{C}$ , and was inhibited by addition of  $20 \text{ mM } \alpha\text{GalNAc}$  or by lowering the temperature. Interestingly, internalization of free porphyrin (using a similar concentration) was not detectable at  $37^\circ\text{C}$ , even after 90 min incubation, whatever the technique used (data not shown). These results establish that porphyrin adducts on MorG did not interfere with lectin specificity and its internalization by Jurkat cells.

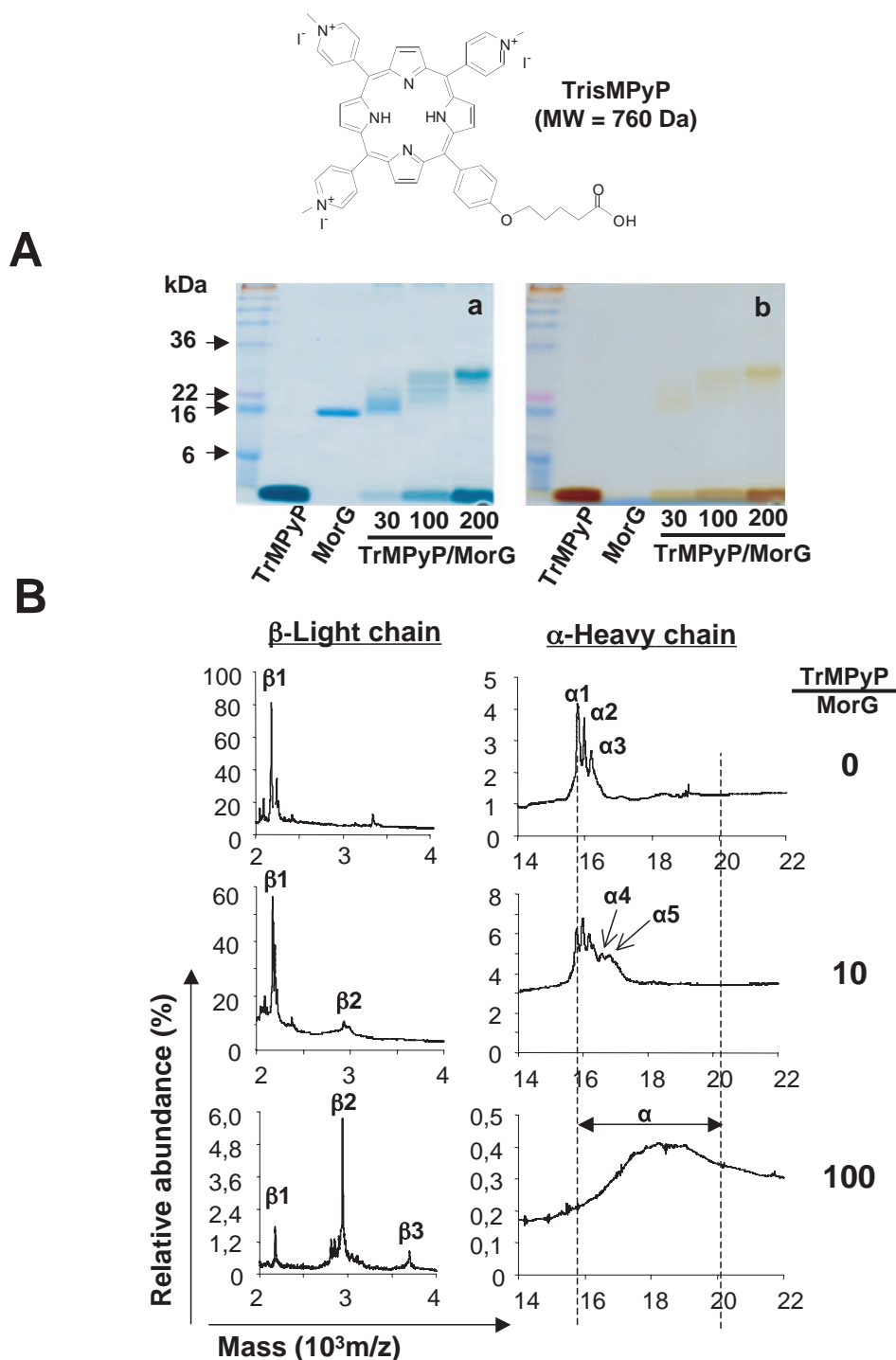
To determine whether the binding and internalization of TrMPyP–MorG by tumor cells resulted in an increase of porphyrin-mediated cytotoxicity after PDT, the ability of various concentrations ( $10$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$  and  $10^5 \text{ nM}$ ) of free porphyrin, free lectin and TrMPyP–MorG conjugate to induce Jurkat cell death was compared. In the absence of irradiation: (1) whatever the studied molecule, no toxicity was observed until  $10^2 \text{ nM}$ ; (2) free lectin or TrMPyP–MorG conjugate induced moderate cytotoxicity from  $10^3 \text{ nM}$  (5–10% of cell

death for  $10^3 \text{ nM}$ ); and (3) TrMPyP was not toxic. After irradiation, toxicity was noticed from  $10^4 \text{ nM}$  free porphyrin (about 40% and 100% of cytotoxicity with  $10^4$  and  $10^5 \text{ nM}$  free porphyrin, respectively), whereas a dramatic cell death was observed with  $10 \text{ nM}$  TrMPyP–MorG (Fig. 4C). Finally, the phototoxicity of the conjugate ( $10 \text{ nM}$ ) was evaluated comparatively on Jurkat leukemic T lymphocytes and normal T lymphocytes from healthy donors. Under the experimental conditions tested, and in accordance with the lower binding of FITC-labeled MorG to T cells (Fig. 1A), the normal T lymphocytes were clearly resistant to conjugate-mediated phototoxicity (Fig. 4D).

## DISCUSSION

The present work demonstrates for the first time the feasibility of a covalent coupling of a PS with a plant lectin, to produce a hydrophilic conjugate suitable for photochemotherapy. To our knowledge, covalent binding of PS has been performed only using proteins without targeting capacity (23,24) or with monoclonal antibodies (10,11,25). Whereas antibodies are the most successful binding molecules in biomedicine, their use is still limited in drug targeting, for instance by the difficulty and expensiveness of manufacturing, and the relative instability, mainly under reducing intracellular conditions or under conditions of covalent coupling with drug (26). The instability is generally increased with the small versions of antibodies, such as Fab or scFv fragments and multivalent miniantibodies, and the recognizing specificity can be altered by the binding of drug to antibody (26). Obviously, monoclonal antibody-targeted PS are more selective for targeting cells than free PS, but today these immunoconjugates have demonstrated a modest efficacy *in vivo* (10) or *in vitro* (25) or can even be less phototoxic than free PS on a per mole basis (11). On the contrary, TrMPyP–MorG conjugate dramatically increased the cytotoxic potency of porphyrin as compared to the free molecule in *in vitro* phototoxicity experiments, using leukemic T cells. This efficiency could be attributed, at least partly, to molecular stability of the lectin during and after the conjugate

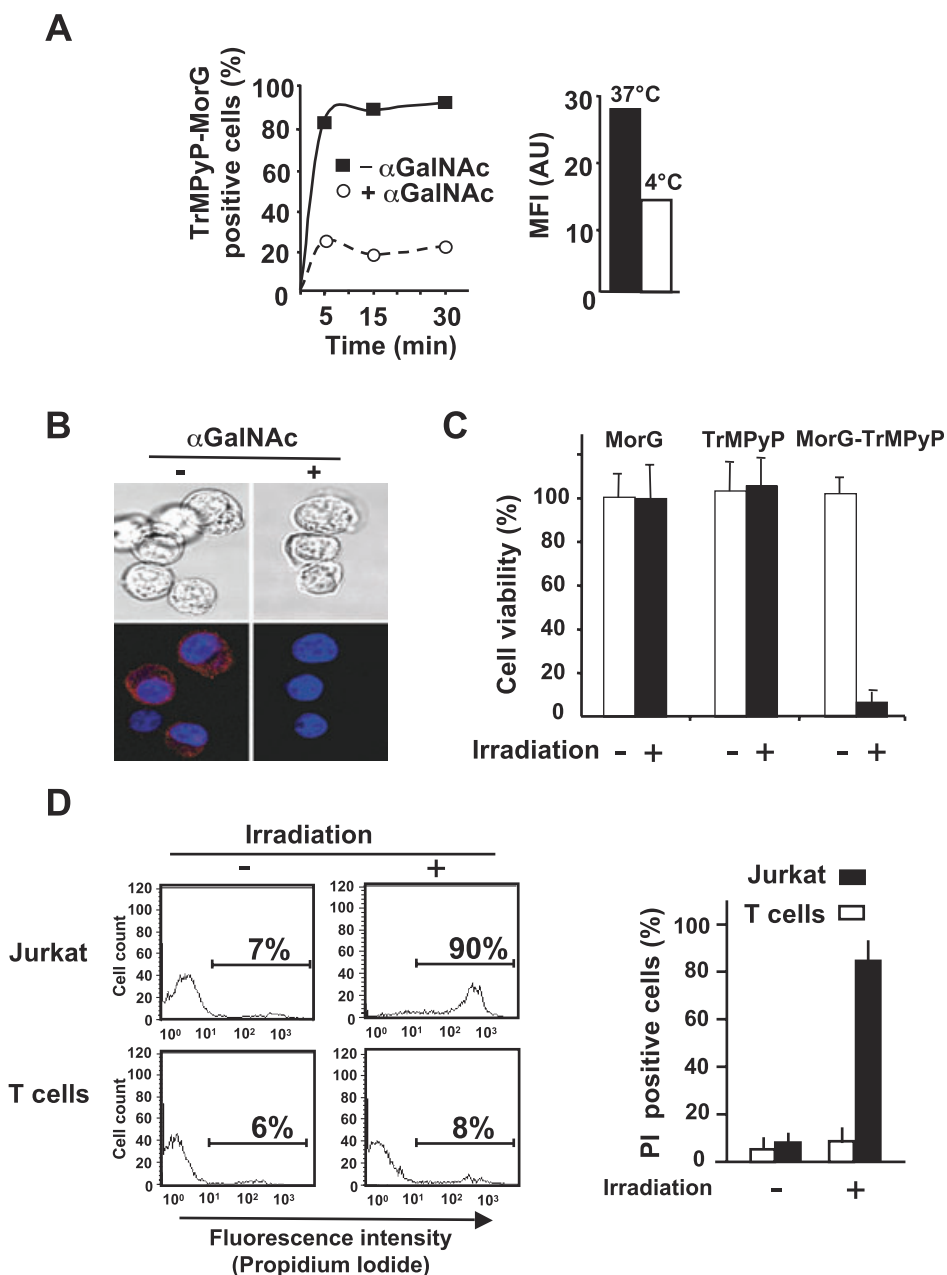




**Figure 3.** Chemical characterization of 5-[(4-(5-carboxy-1-butoxy)phenyl)-10,15,20-tris(4-*N*-methylpyridinium)] porphyrin (TrMPyP)–Morniga G (MorG) conjugates. TrMPyP, (MW = 760 Da) was covalently linked to MorG, using various TrMPyP/MorG ratios: 10, 30, 100 and 200 equivalents of TrMPyP per lectin tetramer. (A) SDS-PAGE analysis of different conjugates (TrMPyP–MorG) before (b) and after (a) Coomassie blue staining. (B) Mass spectrometry analysis of TrMPyP–MorG conjugates. Mass analysis of the  $\beta$ -light and  $\alpha$ -heavy chains of the protein are shown for the protein alone (TrMPyP/MorG = 0) or for conjugates performed with 10 or 100 porphyrin/MorG ratios.

preparation. Indeed, the structure of plant lectins confers strong resistance to heat and chemical denaturing. The coupling of TrMPyP to MorG affected neither the specific binding of the lectin toward its glycotope, nor its uptake by target cells. These results indicate that the conjugate retained

the native structure of the lectin. It was also stable because the molecule conserved its toxic activity after storage for at least 1 year at 4°C in PBS. Interestingly, preliminary evaluation of TrMPyP–MorG conjugate photobleaching indicated that, after irradiation (7.5 min, 1.7 J cm<sup>-2</sup> light dose) the conjugate



**Figure 4.** Uptake of porphyrin–Morniga G conjugates by Jurkat cells and *In vitro* evaluation of TrMPyP–MorG-mediated toxicity after photodynamic therapy. (A) Left, flow cytometry analysis of Jurkat cells incubated in the dark for the indicated times with TrMPyP–MorG (150 nM) at 37°C, with or without  $\alpha$ GalNAc (20 mM). Analysis was performed for optimal detection of TrMPyP fluorescence. Right, mean fluorescence intensity (MFI) of TrMPyP–MorG positive cells, incubated for 30 min at 4°C or 37°C (mean of two independent experiments). (B) Confocal microscopy analysis of TrMPyP–MorG endocytosis. Jurkat cells were incubated in the dark for 5 min with 150 nM TrMPyP–MorG at 37°C, with or without 20 mM  $\alpha$ GalNAc. Upper panel, phase contrast microscopy; Lower panel, TrMPyP–MorG red fluorescence. (C) Jurkat cells ( $10^6$  mL $^{-1}$ ) were incubated with 10 nM of MorG, TrMPyP or TrMPyP–MorG for 15 min at 37°C in the dark. After washing, cells were irradiated (+) or not (–) for 7.5 min, and the cell viability was evaluated using MTT assay after 16 h incubation at 37°C in the dark. Results are means  $\pm$  SD from three independent experiments. (D) T lymphocytes isolated from healthy donors and Jurkat T cells were incubated with TrMPyP–MorG (10 nM) and irradiated (+) or not (–), as described above in (C). Four hours after light exposure, cells were stained by propidium iodide and analyzed by flow cytometry. Left, representative cytometry analysis. Right, means  $\pm$  SD from three independent experiments.

solution (5  $\mu$ M) was less photobleached than free TrMPyP (5  $\mu$ M): residual absorbances were  $92 \pm 3\%$  and  $73 \pm 4\%$ , respectively ( $n = 3$ ), suggesting that the lectin could protect the porphyrin from photodegradation.

Most PS in use today accumulates in tumors because they are hydrophobic molecules. The present work suggests that

conjugation of other PS with plant lectin may enable the targeting of hydrophilic molecules and their efficient tumor retention, therefore increasing the number of available PS for tumor treatment. In addition, the coupling technique used in our study allows the linkage of MorG to various PS: cationic, anionic, neutral or activatable in the red light. The relative

simplicity of the extraction of lectin from the bark of black mulberry tree, and the easiness of chemical linkage, predict that such coupling with plant lectins could be commercially realistic. Finally, plant lectins can be prepared by bioengineering (27).

Morniga G recognizes different sets of glycotopes (mainly T and Tn structures) and probably can discriminate between subtle glycosylation modifications (18,20). As animal lectins or Toll-like receptors, the molecular recognition specificity of plant lectins is wider than BCR, TCR or antibodies. This feature could be an advantage for tumor targeting by increasing the number of putative target glycotopes for the conjugate. In addition, because FITC-labeled MorG can efficiently bound to Jurkat leukemia but not to healthy lymphocytes (Fig. 1A), it is tempting to speculate that TrMPyP–MorG conjugate can discriminate alterations of glycoconjugates between leukemic and healthy lymphocytes. Indeed, the present experiments indicate that after irradiation the conjugate can kill preferentially leukemic lymphocytes rather than normal lymphocytes (Fig. 4D). The presence of CD175 (Tn) and CD176 (T) antigens in leukemia cells and their absence in normal mature hematopoietic cells have been previously reported (13). PDT uses PS and visible light to kill solid tumors. Alternatively, ECP is effective for a wide variety of hematologic disorders, such as T cell lymphoma (7). After cytopheresis, mononuclear cells, containing healthy and tumor cells, are PS-treated, irradiated and reinfused to the patient. The PS targeting using a plant lectin, such as MorG, could allow the specific elimination of T/Tn-positive leukemic cells and the preservation of healthy lymphocytes, increasing the phototoxic efficacy and the number of clinical applications of ECP.

The use of plant lectins for targeting *in vivo* and *ex vivo* might be limited by (1) the toxicity of certain lectins; and (2) their immunogenicity for humans. While some lectins, such as ConA (28), are toxic at high doses (2), they demonstrated clear immunostimulating effects and anticancer activities *in vivo* in animal models at lower doses (2–4). Similarly, MorG can activate lymphocytes *in vitro* (unpublished data). Regarding the immunogenicity of lectins as an apparent barrier to *in vivo* use, this limit could be partially overcome or controlled because potential mechanisms of tolerance probably exist *in vivo* for food lectins. For instance, the Peanut Agglutinin (PNA) (a T [CD176] antigen-specific lectin [1]) is immunogenic and can be involved, along with other peanut proteins, in severe anaphylactic reactions in allergic patients (29–31). However, the intact PNA can be detected in the circulation (up to 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) of normal individuals after oral ingestion of peanuts (32), without detectable adverse immune reactions.

Because of the binding property and endocytic capacity of FITC–MorG and of TrMPyP–MorG, the lectin appears to be an interesting candidate for the selective targeting toward T/Tn antigens and as an endocytic ligand for intracellular transport of drugs in tumor cells. Regarding the cellular mechanism of TrMPyP–MorG-induced toxicity after white-light irradiation, the present work suggests that the quick uptake of the conjugate play a role in cell death. Whether only internalized conjugate or, additionally, the cell surface bound conjugate contributes to cytotoxicity needs to be investigated.

In conclusion, the efficiency of phototoxicity in the experiments using the covalent TrMPyP–MorG conjugate suggests

that the conjugation of PS with this type of plant lectin could be advantageously employed in photochemotherapy to increase PS phototoxicity and for targeting toward tumors with alterations of protein and lipid glycosylation at their surface.

*Acknowledgements*—The financial support of the Université Paul Sabatier, INSERM, CNRS and Fund for Scientific Research-Flanders is gratefully acknowledged. We thank A. Jauneau, F.E. L'Faqihi-Olive, V. Duplan-Eche, G. Borderies, M.D. Pinteaux, C. Teisseire for their technical assistance.

## REFERENCES

1. Wu, A. M., E. Lisowska, M. Duk and Z. Yang (2009) Lectins as tools in glycoconjugate research. *Glycoconj. J.* **26**, 899–913.
2. Liu, B., H. J. Bian and J. K. Bao (2010) Plant lectins: Potential antineoplastic drugs from bench to clinic. *Cancer Lett.* **287**, 1–12.
3. Miyagi, T., T. Takehara, T. Tatsumi, T. Suzuki, M. Jinushi, Y. Kanazawa, N. Hiramatsu, T. Kanto, S. Tsuji, M. Hori and N. Hayashi (2004) Concanavalin a injection activates intrahepatic innate immune cells to provoke an antitumor effect in murine liver. *Hepatology* **40**, 1190–1196.
4. Amin, A. R., V. S. Thakur, K. Gupta, M. W. Jackson, H. Harada, M. K. Agarwal, D. M. Shin, D. N. Wald and M. L. Agarwal (2010) Restoration of p53 functions protects cells from concanavalin A-induced apoptosis. *Mol. Cancer Ther.* **9**, 471–479.
5. Gao, X., T. Wang, B. Wu, J. Chen, J. Chen, Y. Yue, N. Dai, H. Chen and X. Jiang (2008) Quantum dots for tracking cellular transport of lectin-functionalized nanoparticles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **377**, 35–40.
6. Brown, S. B., E. A. Brown and I. Walker (2004) The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. *Lancet Oncol.* **5**, 497–508.
7. Knobler, R., M. L. Barr, D. R. Couriel, J. L. Ferrara, L. E. French, P. Jaksch, W. Reinisch, A. H. Rook, T. Schwarz and H. Greinix (2009) Extracorporeal photopheresis: Past, present, and future. *J. Am. Acad. Dermatol.* **61**, 652–665.
8. Castano, A. P., P. Mroz and M. R. Hamblin (2006) Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 535–545.
9. del Carmen, M. G., I. Rizvi, Y. Chang, A. C. Moor, E. Oliva, M. Sherwood, B. Pogue and T. Hasan (2005) Synergism of epidermal growth factor receptor-targeted immunotherapy with photodynamic treatment of ovarian cancer *in vivo*. *J. Natl. Cancer Inst.* **97**, 1516–1524.
10. Del Governatore, M., M. R. Hamblin, E. E. Piccinini, G. Ugolini and T. Hasan (2000) Targeted photodestruction of human colon cancer cells using charged 17.1A chlorin e6 immunoconjugates. *Br. J. Cancer* **82**, 56–64.
11. Savellano, M. D., B. W. Pogue, P. J. Hoopes, E. S. Vitetta and K. D. Paulsen (2005) Multiepitope HER2 targeting enhances photoimmunotherapy of HER2-overexpressing cancer cells with pyropheophorbide-a immunoconjugates. *Cancer Res.* **65**, 6371–6379.
12. Gijssens, A., L. Missiaen, W. Merlevede and P. de Witte (2000) Epidermal growth factor-mediated targeting of chlorin e6 selectively potentiates its photodynamic activity. *Cancer Res.* **60**, 2197–2202.
13. Cao, Y., A. Merling, U. Karsten, S. Goletz, M. Punzel, R. Kraft, G. Butschak and R. Schwartz-Albiez (2008) Expression of CD175 (Tn), CD175s (sialosyl-Tn) and CD176 (Thomsen-Friedenreich antigen) on malignant human hematopoietic cells. *Int. J. Cancer* **123**, 89–99.
14. Itzkowitz, S. H., M. Yuan, C. K. Montgomery, T. Kjeldsen, H. K. Takahashi, W. L. Bigbee and Y. S. Kim (1989) Expression of Tn, sialosyl-Tn, and T antigens in human colon cancer. *Cancer Res.* **49**, 197–204.
15. Komath, S. S., K. Bhanu, B. G. Maiya and M. J. Swamy (2000) Binding of porphyrins by the tumor-specific lectin, jacalin [Jack fruit (*Artocarpus integrifolia*) agglutinin]. *Biosci. Rep.* **20**, 265–276.

16. Goel, M., R. S. Damai, D. K. Sethi, K. J. Kaur, B. G. Maiya, M. J. Swamy and D. M. Salunke (2005) Crystal structures of the PNA-porphyrin complex in the presence and absence of lactose: Mapping the conformational changes on lactose binding, interacting surfaces, and supramolecular aggregations. *Biochemistry* **44**, 5588–5596.
17. Pandey, G., T. Fatma and S. S. Komath (2009) Specific interaction of the legume lectins, concanavalin a and peanut agglutinin, with phycocyanin. *Photochem. Photobiol.* **85**, 1126–1133.
18. Singh, T., J. H. Wu, W. J. Peumans, P. Rouge, E. J. Van Damme and A. M. Wu (2007) Recognition profile of *Morus nigra* agglutinin (Morniga G) expressed by monomeric ligands, simple clusters and mammalian polyvalent glycotopes. *Mol. Immunol.* **44**, 451–462.
19. Nyman, E. S. and P. H. Hynninen (2004) Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B* **73**, 1–28.
20. Benoist, H., R. Culerrier, G. Poiroux, B. Segui, A. Jauneau, E. J. Van Damme, W. J. Peumans, A. Barre and P. Rouge (2009) Two structurally identical mannose-specific jacalin-related lectins display different effects on human T lymphocyte activation and cell death. *J. Leukoc. Biol.* **86**, 103–114.
21. Casas, C., B. Saint-Jalmes, C. Loup, C. Lacey and B. Meunier (1993) Synthesis of cationic metalloporphyrin precursors related to the design of DNA cleavers. *J. Org. Chem.* **58**, 2913–2917.
22. Van Damme, E. J., B. Hause, J. Hu, A. Barre, P. Rouge, P. Proost and W. J. Peumans (2002) Two distinct jacalin-related lectins with a different specificity and subcellular location are major vegetative storage proteins in the bark of the black mulberry tree. *Plant Physiol.* **130**, 757–769.
23. Wang, R. M., T. Komatsu, A. Nakagawa and E. Tsuchida (2005) Human serum albumin bearing covalently attached iron(II) porphyrins as O<sub>2</sub>-coordination sites. *Bioconjug. Chem.* **16**, 23–26.
24. Ben Dror, S., I. Bronshtein, H. Weitman, K. M. Smith, W. G. O'Neal, P. A. Jacobi and B. Ehrenberg (2009) The binding of analogs of porphyrins and chlorins with elongated side chains to albumin. *Eur. Biophys. J.* **38**, 847–855.
25. Staneloudi, C., K. A. Smith, R. Hudson, N. Malatesti, H. Savoie, R. W. Boyle and J. Greenman (2007) Development and characterization of novel photosensitizer: scFv conjugates for use in photodynamic therapy of cancer. *Immunology* **120**, 512–517.
26. Binz, H. K., P. Amstutz and A. Pluckthun (2005) Engineering novel binding proteins from nonimmunoglobulin domains. *Nat. Biotechnol.* **23**, 1257–1268.
27. Lam, S. K. and T. B. Ng (2010) Lectins: Production and practical applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, in press.
28. Kunstle, G., H. Hentze, P. G. Germann, G. Tiegs, T. Meergans and A. Wendel (1999) Concanavalin A hepatotoxicity in mice: Tumor necrosis factor-mediated organ failure independent of caspase-3-like protease activation. *Hepatology* **30**, 1241–1251.
29. Rouge, P., R. Culerrier, C. Granier, F. Rance and A. Barre (2010) Characterization of IgE-binding epitopes of peanut (*Arachis hypogaea*) PNA lectin allergen cross-reacting with other structurally related legume lectins. *Mol. Immunol.* **47**, 2359–2366.
30. Lopez-Exposito, I., Y. Song, K. M. Jarvinen, K. Srivastava and X. M. Li (2009) Maternal peanut exposure during pregnancy and lactation reduces peanut allergy risk in offspring. *J. Allergy Clin. Immunol.* **124**, 1039–1046.
31. Burks, A. W. (2008) Peanut allergy. *Lancet* **371**, 1538–1546.
32. Wang, Q., L. G. Yu, B. J. Campbell, J. D. Milton and J. M. Rhodes (1998) Identification of intact peanut lectin in peripheral venous blood. *Lancet* **352**, 1831–1832.



**III-2-1-3 Article 4 : Targeting of T/Tn antigens with a plant lectin to kill human leukemia cells by photochemotherapy**



# Targeting of T/Tn Antigens with a Plant Lectin to Kill Human Leukemia Cells by Photochemotherapy

Guillaume Poiroux<sup>1,3</sup>, Marguerite Pitié<sup>4,9</sup>, Raphaël Culerrier<sup>3,9</sup>, Elodie Lafont<sup>1,2</sup>, Bruno Ségui<sup>1,2</sup>, Els J. M. Van Damme<sup>5</sup>, Willy J. Peumans<sup>5</sup>, Jean Bernadou<sup>2,4</sup>, Thierry Levade<sup>1</sup>, Pierre Rougé<sup>3</sup>, Annick Barre<sup>2,3</sup>, Hervé Benoist<sup>1,2\*</sup>

**1** Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale UMR 1037, Equipe 4, Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse, CHU Rangueil, BP84225, 31432 Toulouse, France, **2** Université de Toulouse, Faculté des Sciences Pharmaceutiques, 35 chemin des Maraîchers, 31062 Toulouse, France, **3** Université de Toulouse, UMR UPS-CNRS 5546, 24 Chemin de Borde Rouge, 31326 Castanet-Tolosan, France, **4** Centre National de la Recherche Scientifique, Laboratoire de Chimie de Coordination, 205 route de Narbonne, F-31077, Toulouse, France, **5** Department of Molecular Biotechnology, Laboratory of Biochemistry and Glycobiology, Ghent University, Coupure links 653, B-9000 Ghent, Belgium

## Abstract

Photochemotherapy is used both for solid tumors and in extracorporeal treatment of various hematologic disorders. Nevertheless, its development in oncology remains limited, because of the low selectivity of photosensitizers (PS) towards human tumor cells. To enhance PS efficiency, we recently covalently linked a porphyrin (TrMPyP) to a plant lectin (Morniga G), known to recognize with high affinity tumor-associated T and Tn antigens. The conjugation allowed a quick uptake of PS by Tn-positive Jurkat leukemia cells and efficient PS-induced phototoxicity. The present study was performed: (i) to evaluate the targeting potential of the conjugate towards tumor and normal cells and its phototoxicity on various leukemia cells, (ii) to investigate the mechanism of conjugate-mediated cell death. The conjugate: (i) strongly increased ( $\times 1000$ ) the PS phototoxicity towards leukemic Jurkat T cells through an O-glycan-dependent process; (ii) specifically purged tumor cells from a 1:1 mixture of Jurkat leukemia (Tn-positive) and healthy (Tn-negative) lymphocytes, preserving the activation potential of healthy lymphocytes; (iii) was effective against various leukemic cell lines with distinct phenotypes, as well as fresh human primary acute and chronic lymphoid leukemia cells; (iv) induced mostly a caspase-independent cell death, which might be an advantage as tumor cells often resist caspase-dependent cell death. Altogether, the present observations suggest that conjugation with plant lectins can allow targeting of photosensitizers towards aberrant glycosylation of tumor cells, e.g. to purge leukemia cells from blood and to preserve the normal leukocytes in extracorporeal photochemotherapy.

**Citation:** Poiroux G, Pitié M, Culerrier R, Lafont E, Ségui B, et al. (2011) Targeting of T/Tn Antigens with a Plant Lectin to Kill Human Leukemia Cells by Photochemotherapy. PLoS ONE 6(8): e23315. doi:10.1371/journal.pone.0023315

**Editor:** Jean-Pierre Vartanian, Institut Pasteur, France

**Received:** December 17, 2010; **Accepted:** July 15, 2011; **Published:** August 17, 2011

**Copyright:** © 2011 Poiroux et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** Funding provided by: Université Paul Sabatier; Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U858, I2MR; Centre National de la Recherche Scientifique UMR5546; and Scientific Research Flanders. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

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

\* E-mail: herve.benoist@inserm.fr

**9** These authors contributed equally to this work.

## Introduction

Extracorporeal photochemotherapy (ECP) is reported to be effective for a wide variety of hematologic disorders, such as graft-versus-host disease (GVH) or T cell lymphoma [1]. After cytopheresis, mononuclear cells are treated with a photosensitizer (PS), irradiated by ultraviolet-A (UV-A), and then reinfused to the patient. Alternatively, photodynamic therapy (PDT) uses other PS molecules and visible light to kill solid tumors [2]. Although the molecular mechanisms induced by ECP and PDT partially differ, both photochemotherapy (PCT) methods may be used to decrease the tumor mass. In contrast to surgery, radiotherapy and chemotherapy, PCT is known to stimulate the anti-cancer immunity [3,4,5]. In addition, PCT can be effective against chemo- and radio-resistant tumors [6].

So far, the relative poor selectivity of PS for tumor cells has remained a major drawback for the development of PCT

applications. For instance, ECP efficacy could be increased through targeting of PS to tumor cells, therefore sparing healthy leukocytes, which would be reinfused to the patient with dead malignant leukocytes. With respect to solid tumors, therapeutic selectivity of PDT is achieved from the relative preferential localization of PS in the tumor tissue, owing to its physicochemical properties (e.g., hydrophobicity), and from the control of irradiated areas (e.g., in dermatologic application). However, in complex anatomical sites, such as the thoracic or abdominal cavities, confined irradiation is more difficult and treatment may injure normal tissue. Consequently, targeting of PS by increasing drug concentration in tumor tissues must be sought to enhance PCT efficacy.

Alterations of protein and lipid glycosylation at the cell surface are consistent features of cancers. In tumors, aberrant glycosylation is responsible for incomplete synthesis of the carbohydrate chains, allowing higher expression of precursor carbohydrate

moieties, such as the “T/Tn antigens” [*i.e.* CD176/CD175 antigens or (Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ 1-O-Ser/Thr)/(GalNAc $\alpha$ 1-O-Ser/Thr) epitopes] [7,8]. These glycopeptide antigens are associated with many cancers and represent attractive candidates, among the tumor-associated carbohydrate antigens, for the development of anticancer immune stimulation [9] and drug targeting strategies [10]. Thus, the preparation of anti-Tn antibodies has been reported, but their evaluation in treatment or imaging of tumors is generally inconsistent [10,11].

Along with antibodies, some plant lectins represent targeting-vectors because of their capacity to specifically recognize sugars and to distinguish subtle alterations in glycans on the cell surface [12,13,14]. Thus, Morniga G (MorG), a hetero-tetrameric ( $\alpha$ 4 $\beta$ 4) lectin from *Morus nigra* was described as T/Tn (CD176/CD175) antigen-specific in cell-free systems [15]. Consequently, this lectin can be proposed for drug targeting towards tumor cells strongly expressing T and/or Tn antigens. Recently, we have demonstrated that MorG can be specifically bound and taken-up by a Tn-positive (Jurkat) lymphoid leukemia cell line [16]. For the first time, the lectin was covalently conjugated to TrMPyP (TrMPyP), a cationic and hydrophilic porphyrin known to be white-light activatable [17]. The TrMPyP-MorG conjugate was molecularly characterized. The conjugate (with a 1:1 PS:lectin ratio) was bound and quickly (5 min) taken-up by Jurkat cells. Preliminary data indicate that the conjugate could trigger greater than 90% phototoxicity on leukemic Jurkat cells at 10 nM concentration [16]. In the present work, the role of O-glycosylation recognition for the conjugate-induced phototoxicity was studied. Because of the presence of CD175 and CD176 antigens on leukemia cells and their absence on normal mature hematopoietic cells [7], the conjugate-induced phototoxicity was comparatively evaluated towards Jurkat leukemia T cells (CD175-positive) and healthy T lymphocytes (CD175-negative). The phototoxicity of this new conjugate was also tested against various human leukemia cell lines and fresh primary leukemia cells from patients. Finally, the mechanism of conjugate-mediated phototoxicity was investigated.

## Methods

### Cells and reagents

Jurkat T, Molt 4, CEM, HuT78, K562, KG1, KG1a, HL60 and U937 leukemia cell lines (from ATCC), SKW6.4 cells (EBV-transformed B lymphoid cell line, from ATCC) and ERG cells (EBV-transformed B lymphoid cell line from our laboratory), FADD-deficient Jurkat cells (from Dr. J. Blenis, Boston, MA, USA), caspase 9-deficient Jurkat cells (from Dr. K. Shulze-Osthoff, Düsseldorf, Germany), Caspase 8- and 10-doubly deficient Jurkat cells (from our laboratory [18]) were cultured in RPMI containing 10% FCS (Gibco, Cergy-Pontoise, France). Primary acute lymphoid leukemia (ALL, pre-B phenotype for ALL1, ALL2, and ALL3 and bi T/B phenotype for ALL4, T phenotype for ALL5) samples were obtained from Tumorothèque de Midi-Pyrénées (HIMIP, Inserm-U563, Purpan Hospital, Toulouse). Primary chronic lymphoid leukemia (CLL, B phenotypes) and healthy samples were obtained from Hematology department (Ranguel Hospital, Toulouse). PBMC from healthy donors and leukemic patients were separated using Ficoll-Paque Plus (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) density gradient. Normal T lymphocytes were separated from PBMC using the Rosette Sep human T cell enrichment cocktail (StemCell Technologies, Grenoble, France) [14].

Morniga G (MorG) was purified from the bark of black mulberry tree (*Morus nigra*) and labelled with FITC (Acros Organics, Fisher Scientific, Illkirch, France) as previously described [14]. Anti-CD175

(anti-Tn) mAb and secondary PE-conjugated anti-mouse goat polyclonal antibodies were from Acris Antibodies GmbH (Herford, Germany). z-VAD(OMe)-fmk was purchased from Bachem (Voisins-Le-Bretonneux, France). Mannan, Lactoferrin and Bovine Submaxillary Mucin (BSM) were from Sigma-Aldrich (L'Isle d'Abeau Chesnes, France).

### Ethics statement

Fresh and thawed samples from ALL patients have been obtained after informed consent and stored at the HIMIP collection. According to the French law, HIMIP collection has been declared to the Ministry of Higher Education and Research (DC 2008-307 collection 1) and obtained a transfer agreement (AC 2008-129) after approbation by the “Comité de Protection des Personnes Sud-Ouest et Outremer II” (ethical committee). Clinical and biological annotations of the samples have been declared to the CNIL (Comité National Informatique et Libertés ie Data processing and Liberties National Committee).

Blood samples from healthy donors and chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients were collected by Hematology department (Ranguel Hospital, Toulouse), after patients' written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki. For CLL, the samples were waste material took in diagnostic goal.

### Preparation and characterization of TrMPyP-MorG conjugates

TrisMPyP [5-(4-(5-carboxy-1-butoxy)-phenyl)-10,15,20-tris(4-N-methyl-pyridiniumyl-porphyrin)] was synthesized and its N-hydroxysuccinimidyl activated ester was prepared as described previously [19], then TrMPyP-MorG conjugates were prepared and characterized using SDS-PAGE analysis, MALDI-TOF mass spectrometry analysis and spectrophotometry analysis [16]. A TrMPyP-MorG conjugate with a mean of 1 PS per MorG lectin molecule and without alteration of the sugar recognition specificity of MorG was selected and used in the present experiments.

### Photodynamic treatment and cell death evaluation

Cells ( $10^6$ /mL) were exposed to MorG, TrMPyP or TrMPyP-MorG, with or without inhibitory sugar or glycoprotein solutions for 15 min at 37°C, then washed. Because TrMPyP is white-light activatable, cells were irradiated with a bank of four white fluorescent tubes (Philips master TL-D 18W/840) for 7.5 min (1.7 J/cm<sup>2</sup> light dose). Cell viability was evaluated using the MTT reduction method (Euromedex, Souffelweyersheim, France) or by flow cytometry using Annexin V-FITC and/or propidium iodide staining (AbCys, Paris, France). The formation of acidic vesicular organelles (AVOs, including autolysosomes) was evaluated by flow cytometry using the pH-sensitive fluorescent dye acridine orange (AO; Sigma). In viable cells, the concentration of AO in lysosomes results in high red fluorescence. Starvation-induced autophagy triggers an increase of red fluorescence of cells corresponding to an increased number of AVOs [20]. Cell morphology was analyzed using Syto 13 (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) and propidium iodide (PI) staining and a fluorescence-equipped microscope (Olympus, SELI, Toulouse, France) as previously described [21].

A mixture of freshly isolated healthy T lymphocytes and Jurkat T cells was treated by photochemotherapy. The percentage of each cell type was determined before and after PCT treatment by flow cytometry, using the cell size and CD1d mAb staining (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA). T lymphocytes were defined as CD1d-negative cells with low size and Jurkat T cells as CD1d-positive cells with a greater size. In some experiments, 24 h after

PCT the mixture was incubated for 48 h with anti-CD28 mAb (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; clone L283, Becton Dickinson), anti-CD3 mAb (10 ng/mL; Orthoclone, Janssen-Cilag, Issy-les-Moulineaux, France) and Interleukin-2 (100 UI/mL; BD Pharmingen). Then, T lymphocyte activation was checked by flow cytometry using a FITC-labelled anti-CD25 mAb (BD Pharmingen) in the CD3+/CD1d- lymphocyte population.

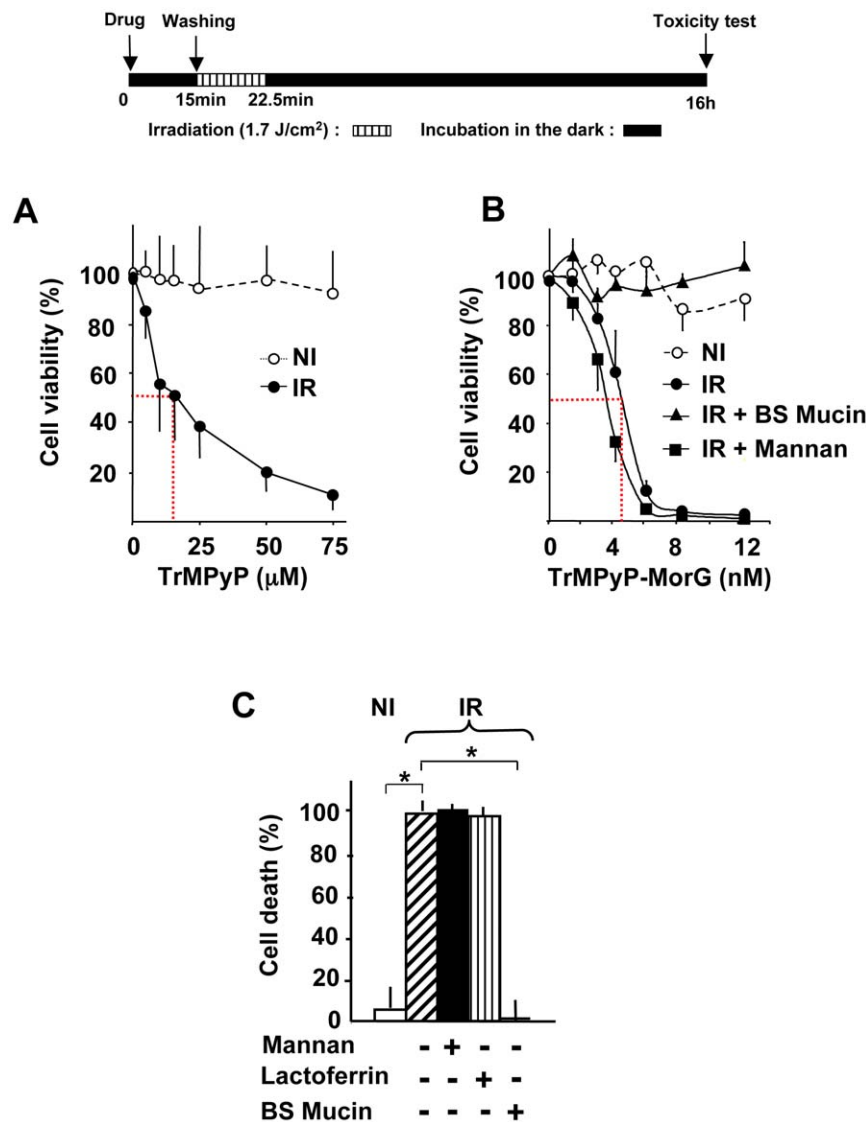
### Western blot analysis

Protein extracts (20  $\mu\text{g}$ ) were separated on SDS-PAGE and blotted on nitrocellulose membranes. The blots were analyzed using anti-cleaved PARP, anti-caspase 9 and anti-caspase 3, anti-LC3B (Cell Signaling Technology, Danvers, MA) or anti- $\beta$ -actin (Sigma) antibodies, as described elsewhere [22]. Proteins extracted

from FasL-treated Jurkat T cells served as a control for caspase-dependent cell death [18] whereas those from Jurkat cells cultured for 24 h in HBSS medium (without amino acids and FCS, Gibco) were used as a control for starvation-induced autophagy [23]. To quantify the bands obtained by Western blot analysis of LC3B proteins, the ImageJ software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) was used. The ratio between areas under the curve (AUC) for LC3-II and LC3-I was calculated for each condition.

### ROS and ceramide production

ROS (Radical Oxygen Species) production was assessed as previously described [24] using the  $\text{H}_2\text{DCFDA}$  probe (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Ceramide levels were measured as previously reported [25], using recombinant DAG kinase



**Figure 1. *In vitro* evaluation of O-glycan dependency of TrMPyP-MorG-mediated phototoxicity.** Jurkat T cells ( $10^6/\text{mL}$ ) were incubated with various TrMPyP or TrMPyP-MorG concentrations for 15 min at  $37^\circ\text{C}$  in the dark. After washing, cells were irradiated (IR) or not (NI) by white light for 7.5 min (allowing a  $1.7 \text{ J}/\text{cm}^2$  light dose), and the cell viability was evaluated using MTT assay after 16 h incubation at  $37^\circ\text{C}$  in the dark. **(A)** Toxicity of free TrMPyP. **(B)** Cells were incubated with or without TrMPyP-MorG in the presence of Bovine Submaxillary Mucin (BSM) or Mannan (1 mg/mL). Of note, in the absence of irradiation no significant toxicity was observed at any TrMPyP-MorG concentrations (Anova test). **(C)** Protective effect of BSM (1 mg/mL) as compared to Lactoferrin (a N-glycosylated glycoprotein, 1 mg/mL) and Mannan on TrMPyP-MorG (15 nM)-induced PCT. Results are means  $\pm$  SD from 3–5 independent experiments. \*  $P < 0.001$ , Anova test, as compared to IR (as well as to IR+ Mannan or IR+ lactoferrin). doi:10.1371/journal.pone.0023315.g001

(a kind gift from Drs. D Perry and YA Hannun; Charleston, NC, USA).

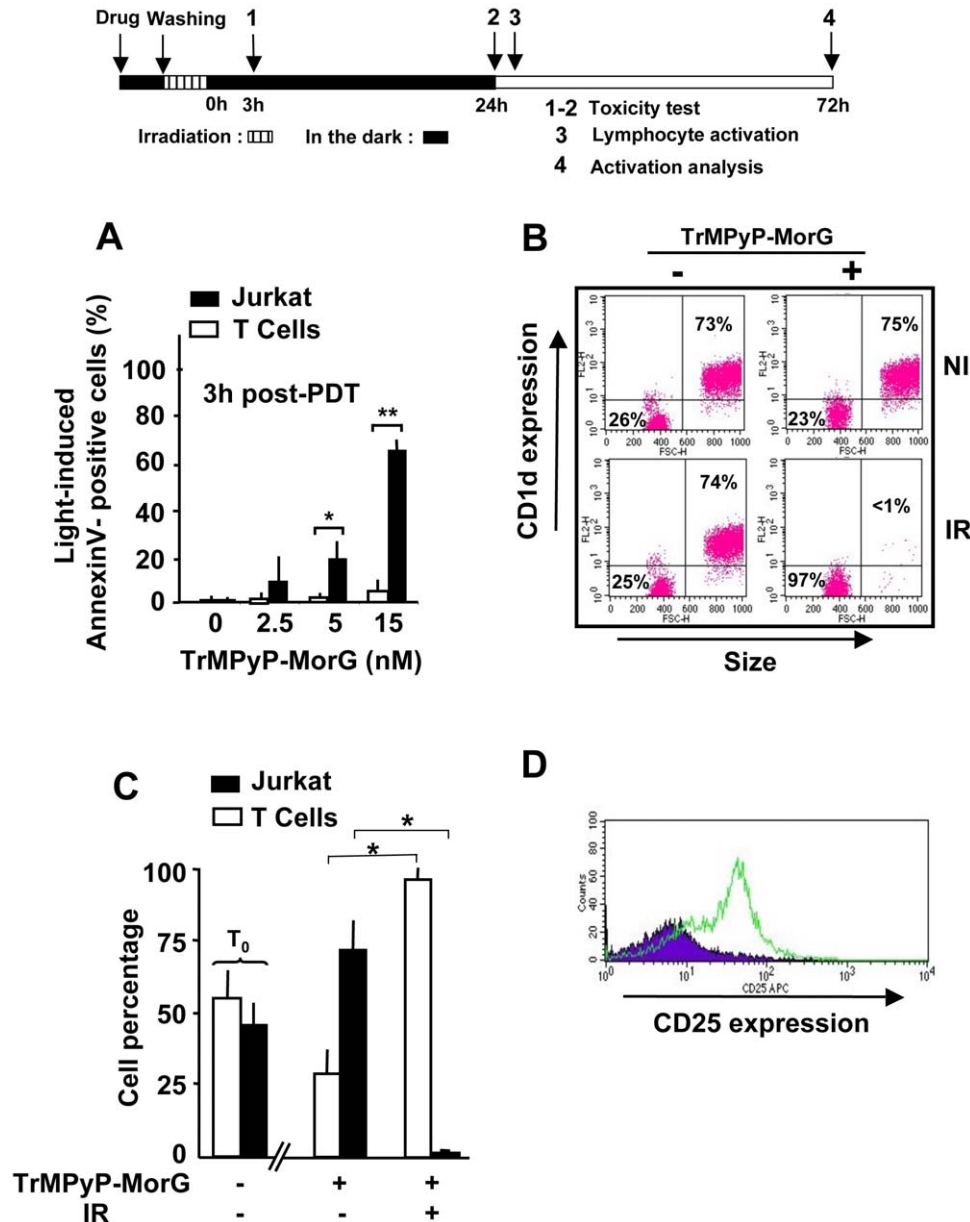
### Statistical analysis

Results are expressed as the means  $\pm$  SD or SEM of data obtained from at least 3 independent experiments. Statistical significance, determined by means of Student's *t*-test and/or Anova test, was considered when  $P < 0.05$ .

### Results

The TrMPyP-MorG conjugate triggers O-glycan-dependent cell death of Tn-positive Jurkat cells after white-light irradiation

Previously, using various concentrations of TrMPyP-MorG we demonstrated that a 10 nM concentration induced  $>90\%$  phototoxicity on Jurkat leukemia cells, whereas 10 nM of free



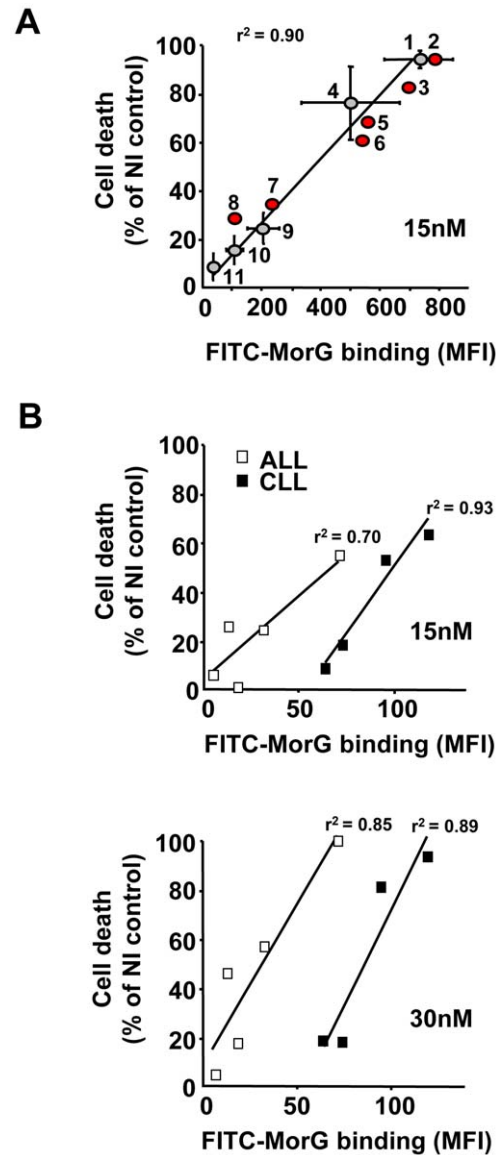
**Figure 2. Effect of TrMPyP-MorG and PCT on a mixture of Jurkat leukemia T cells and healthy T lymphocytes.** (A) T lymphocytes isolated from healthy donors and Jurkat T cells were incubated with TrMPyP-MorG and irradiated as described in the legend to Figure 1. Three hours after white light exposure (1.7 J/cm<sup>2</sup>), cells were stained by Annexin V-FITC and analyzed by flow cytometry. Results are means  $\pm$  SD of 3 independent experiments. \*\*  $P < 0.01$  and \*  $P < 0.05$  as calculated using student *t* test. Application of Anova test showed a very significant ( $P = 0.0026$ ) difference in the susceptibility of Jurkat and T lymphocytes to TrMPyP-MorG-induced phototoxicity. (B–D) T lymphocytes ( $10^6$ /mL) from healthy donors were mixed with Jurkat T cells ( $10^6$ /mL), then treated or not by TrMPyP-MorG (15 nM) and white light (1.7 J/cm<sup>2</sup>). (B–C) The cell mixture was analyzed by flow cytometry after 24 h culture. As compared to T lymphocytes, Jurkat T cells were characterized by a higher size and by CD1d positivity. (B) Representative experiment, (C) means  $\pm$  SD of results from 4 independent experiments.  $T_0$  shows the percentage of the two cell types in the cell mixture before TrMPyP-MorG addition. Significant changes (\*  $P < 0.001$ , Anova test) in cell percentage before and after irradiation were observed. (D) 24 h post-PCT, the TrMPyP-MorG treated cell mixture was incubated for 48 h with (empty histograms) or without (full histograms) IL-2+anti-CD3 and anti-CD28 monoclonal antibodies. Then CD3+/CD1d- lymphocytes were analyzed by flow cytometry for CD25 expression as a marker for lymphocyte activation. doi:10.1371/journal.pone.0023315.g002

TrMPyP was non toxic [16]. To specify: (i) the dose effect of the conjugate after PCT and (ii) the dependency of O-glycosylation recognition for TrMPyP-MorG-mediated phototoxicity, cells were incubated for 15 min with various conjugate concentrations and with or without complex glycosylated molecules (Figure 1). Under our experimental conditions, with or without white-light irradiation, the free lectin seemed not toxic up to 1  $\mu$ M (Figure S1). While no toxicity was noticed after incubation with free porphyrin or TrMPyP-MorG in the absence of irradiation (NI), a dose-dependent cell death was observed with both agents after irradiation (IR) (Figure 1A and B). Of special interest was the finding that, whereas a LD<sub>50</sub> close to 15  $\mu$ M was observed for free porphyrin (Figure 1A), a LD<sub>50</sub> of 5 nM was found using the TrMPyP-MorG complex (Figure 1B), indicating a porphyrin phototoxicity increased by at least a factor of 1000. During incubation with the conjugate, the addition of Bovine Submaxillary Mucin (BSM) totally inhibited cell death, whereas addition of mannan (a mannose polymer, Figure 1B) or lactoferrin (an only N-glycosylated glycoprotein, Figure 1C) did not prevent Jurkat cell death. Thus, because BSM is a glycoprotein containing high density O-linked cryptic polyvalent T/Tn glycotopes, the phototoxicity induced in Jurkat cell line by the TrMPyP-MorG conjugate is probably dependent of O-glycosylation specific recognition and probably of T/Tn antigens at the cell surface.

### TrMPyP-MorG conjugate-mediated cytotoxicity allows selective depletion of Jurkat cells and killing of various leukemia cells

The T lymphocyte-surface glycosylation is modified during T-cell development as well as T-cell activation [26] or oncogenesis [27]. Human Jurkat leukemia cells are known to have a T lymphocyte phenotype (for instance, they express a CD3 complex and a  $\alpha/\beta$  TCR) but an aberrant glycosylation. Indeed, its O-glycosylation pattern is characterized by an overexpression of CD175 antigen, i.e. Tn antigen, due to UDP-Gal:GalNAc  $\alpha$ 1-ser/thr  $\beta$ 1–3 galactosyl-transferase deficiency [28]. On the contrary, normal T lymphocytes are CD175-negative [7]. To further evaluate the targeting potential of the TrMPyP-MorG conjugate, its toxicity was comparatively tested against Jurkat leukemia T cells and isolated peripheral T lymphocytes. Previously, it was observed that healthy T lymphocytes slightly bound a fluorescein-labelled MorG whereas Jurkat leukemia T cells strongly bound it [16]. Of particular interest was the finding that Jurkat leukemia T cells were significantly more susceptible to PCT-induced cell death than normal T cells at 5 nM (the LD<sub>50</sub>) and 15 nM concentrations (Figure 2A), suggesting that the therapeutic index of the conjugate could be sufficient to preserve healthy lymphocytes from phototoxicity in the blood of leukemic patients, with the perspective of extracorporeal photochemotherapy. When PCT was applied to a 1:1 mixture of Jurkat T cells and T lymphocytes, virtually all the leukemic cells were killed whereas healthy T cells survived, at least during the 24 h post-treatment (Figure 2 B and C). Of note, in the absence of irradiation, the percentage of normal T-lymphocytes in the mixture decreased to 25% after 24 h of culture, because Jurkat cells continued to grow while naïve lymphocytes did not (Figure 2C). Interestingly, after irradiation the healthy lymphocytes remained functionally competent, as CD25 expression increased 72 h after PCT upon immune stimulation (Figure 2D).

Using hematopoietic cell lines of various origins, PDT-induced toxicity of TrMPyP-MorG was directly correlated with the level of FITC-labelled MorG binding [as evaluated at 4°C, as previously described [16]] to the cells (Figure 3A). Two different sets of cell lines could be distinguished. The first group with high MorG



**Figure 3. Effect of TrMPyP-MorG and PCT on human hematopoietic cell lines and leukemia cell samples.** Human cell lines or fresh samples from patients with acute (ALL) or chronic (CLL) lymphoid leukemia were treated with TrMPyP-MorG and white light (1.7 J/cm<sup>2</sup>), as previously indicated for Jurkat T cells, and cell viability was determined using MTT assay 24 h after irradiation. Cell death is expressed as a percentage of non-irradiated control cells. Concomitantly, the binding (30 min at 4°C) to the cells of FITC-MorG (0.125  $\mu$ g/mL) was evaluated by flow cytometry (Mean fluorescence intensity (MFI) was measured). (A) Correlation between lectin binding and phototoxicity after treatment with 15 nM TrMPyP-MorG using Jurkat (1), Molt 4 (3) and CEM (7) (T lymphoid leukemia cell lines), HuT78 (9) (a Sezary T lymphoma cell line), ERG (4) and SKW 6.4 (6) (EBV-transformed B lymphoid cell lines), KG1a (2), KG1 (5), HL60 (8), K562 (10), U937 (11) (myeloid leukemia cell lines) cells. (B) Correlation between lectin binding and phototoxic effect after treatment with 15 nM or 30 nM TrMPyP-MorG of fresh primary ALL and CLL from five and four different patients, respectively. Results are the means  $\pm$  SEM of 3–6 independent experiments for cell lines 1, 4, 9, 10 and 11, means of 2 independent experiments for other cell lines, and the mean of quadruplicate determination for leukemia samples.  $r^2$  = linear correlation index.

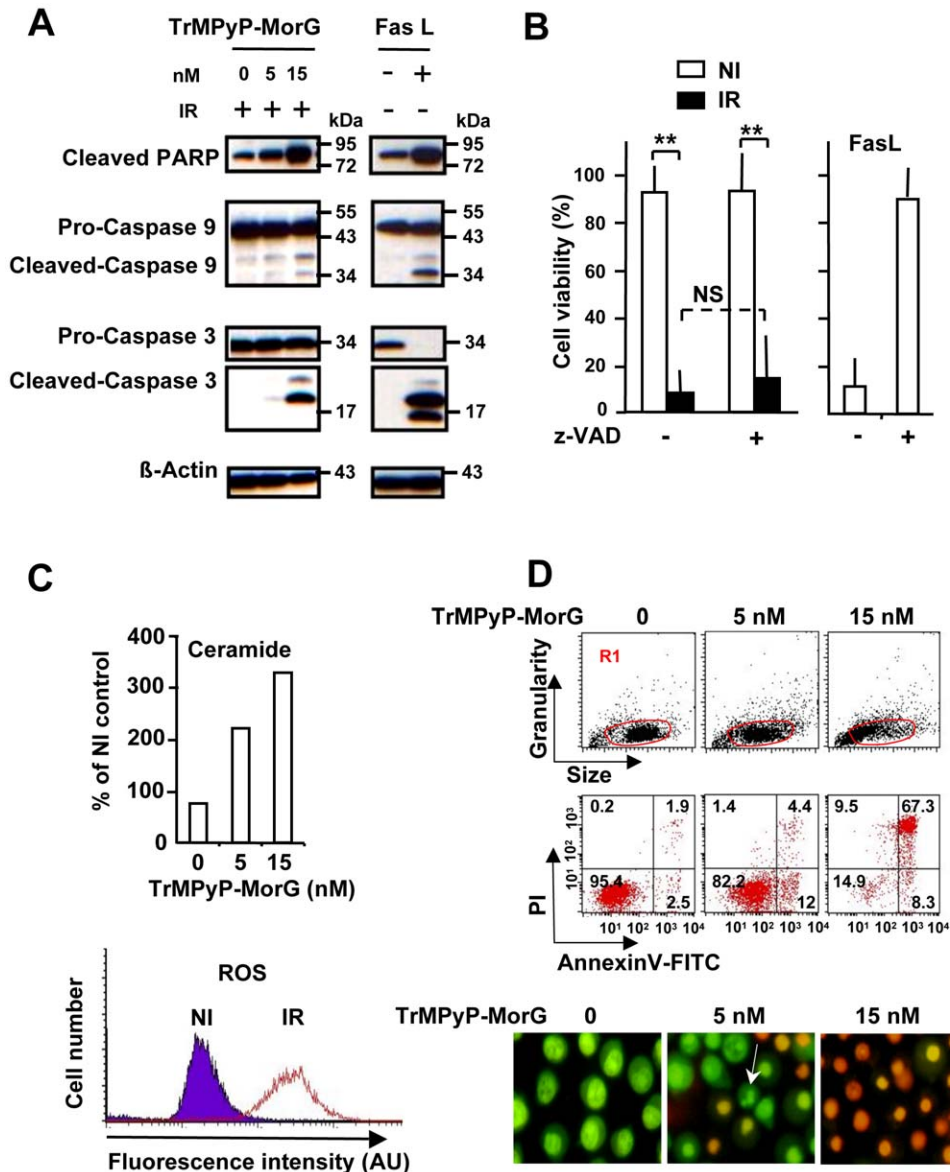
doi:10.1371/journal.pone.0023315.g003



binding, which exhibit a high sensitivity to phototoxicity, included Jurkat and Molt4 cells (two T-lymphoid leukemia cell lines), KG1 and KG1a (two myeloid leukemia cell lines) and ERG and SKW6.4 cells (two EBV-transformed B lymphoid cells). The second group showed little sensitivity or even resistance to phototoxicity.

Because PCT is currently used in the clinic to treat T cell lymphoma in ECP protocols, the conjugate was evaluated against

various lymphoid malignancies. The incubation of different acute (ALL) or chronic (CLL) lymphoid leukemia primary cells from patients confirmed that PCT-induced toxicity (as assessed by MTT) increased with the TrMPyP-MorG dose and was correlated with the level of MorG-binding on tumor cells, supporting the notion that treatment efficiency mainly depends on lectin-binding at the cell surface (Figure 3B). When the number of patients' primary leukemic cells was large enough, the



**Figure 4. Cell death signaling triggered by PCT using TrMPyP-MorG conjugate.** Jurkat T cells ( $10^6/\text{mL}$ ) were incubated with various TrMPyP-MorG concentrations for 15 min at  $37^\circ\text{C}$  and in the dark. After washing, cells were irradiated (IR) or not (NI), for 7.5 min. **(A)** Western blot analysis of cells 3 h post-irradiation. FasL (50 ng/mL) was used as a control for inducing apoptosis. **(B)** Jurkat T cells were incubated in the presence (+) or absence (-) of  $20\ \mu\text{M}$  of the pan-caspase inhibitor (z-VAD), then treated by TrMPyP-MorG (15 nM) and irradiated (IR) or not (NI). FasL-induced cell death was used as a control. Cell death was analyzed using MTT assay, 24 h after PCT. Results are means  $\pm$  SD of 4 separate experiments (similar results were obtained with 5 nM TrMPyP-MorG), \*\*  $P < 0.001$ , Anova test; NS, not significant. **(C)** Intracellular ceramide concentration was determined 3 h after PCT. Results are expressed as percentage of the ceramide levels in drug-treated controls without irradiation (mean of two separate experiments; similar results were observed 24 h post-PCT). Cellular ROS levels were analyzed using flow cytometry. Representative results after TrMPyP-MorG (5 nM) treatment and 15 min post-irradiation. **(D)** Three hours after irradiation, cells were stained with AnnexinV-FITC/PI (upper panel) or Syto13/PI (lower panel) and cell death was evaluated by flow cytometry (in gate R1, defined to exclude cell debris from the analysis) or by fluorescence microscopy, respectively. The arrow indicates a cell with classical features of apoptosis (reduction of cellular volume, nuclear fragmentation, PI exclusion).

doi:10.1371/journal.pone.0023315.g004



toxic effect was further confirmed using annexin V-FITC/PI staining (Figure S2).

### The TrMPyP-MorG conjugate kills Jurkat T leukemia cells mainly through a caspase-independent pathway

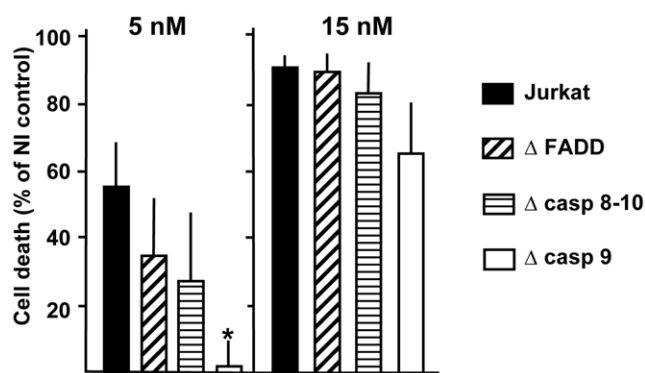
To analyse the mechanisms of cell death triggered by the conjugate, experiments were conducted to test whether an apoptotic, caspase-dependent pathway was activated. As a control for apoptosis, Jurkat cells were treated with FasL (and without irradiation). Western blot analysis demonstrated the cleavage of caspase 3 (effector caspase) and caspase 9 (initiator caspase) and PARP (a nuclear target of effector caspase), indicating that TrMPyP-MorG used in PCT triggered caspase activation (Figure 4A). However, when a pan caspase-inhibitor (zVAD-fmk) was added, no significant inhibition of cell death was observed, suggesting the limited involvement of caspases in the phototoxic effect of the conjugate (Figure 4B). Accordingly, variants of Jurkat cells being deficient for different proteins of the caspase signalling pathway [i.e. FADD (Fas-Associated protein with Death Domain), caspase 9-, as well as caspase 8 and 10 doubly-deficient cells] were not significantly protected from TrMPyP-MorG-induced cell death, even though caspase 9-deficient Jurkat cells were resistant to 5 nM, but not 15 nM, of conjugate (Figure 5). In addition, TrMPyP-MorG conjugate-induced cell death was characterized by an increase of both intracellular ROS and ceramide levels (Figure 4C). Finally, TrMPyP-MorG induced cell death was associated with: (i) phosphatidylserine externalization (i.e., AnnexinV-FITC staining) (Figure 4D, high), (ii) membrane permeability increase (i.e., PI staining), and (iii) a combination of morphological features of necrosis (PI staining) and apoptosis (chromatin condensation, nuclear fragmentation) (Figure 4D, bottom). When TrMPyP-MorG-treated cells were stained with PI or acridine orange (AO), the irradiation resulted in a strong PI staining together with a decrease of AO fluorescence (Figure 6A). In normal cells, when retained in lysosomes AO traps the protons and emits a red fluorescence. Induction of autophagy is characterized by AVO formation and an increased AO red fluorescence emission [20,23]. Our present findings suggest that the increase of plasma membrane permeability is accompanied by a loss of lysosomal membrane

integrity and the release of the accumulated AO from lysosomes. Nonetheless, under our experimental conditions, irradiation of conjugate-treated cells induced a modest increase of LC3-II level, known to be an autophagic marker (Figure 6B).

### Discussion

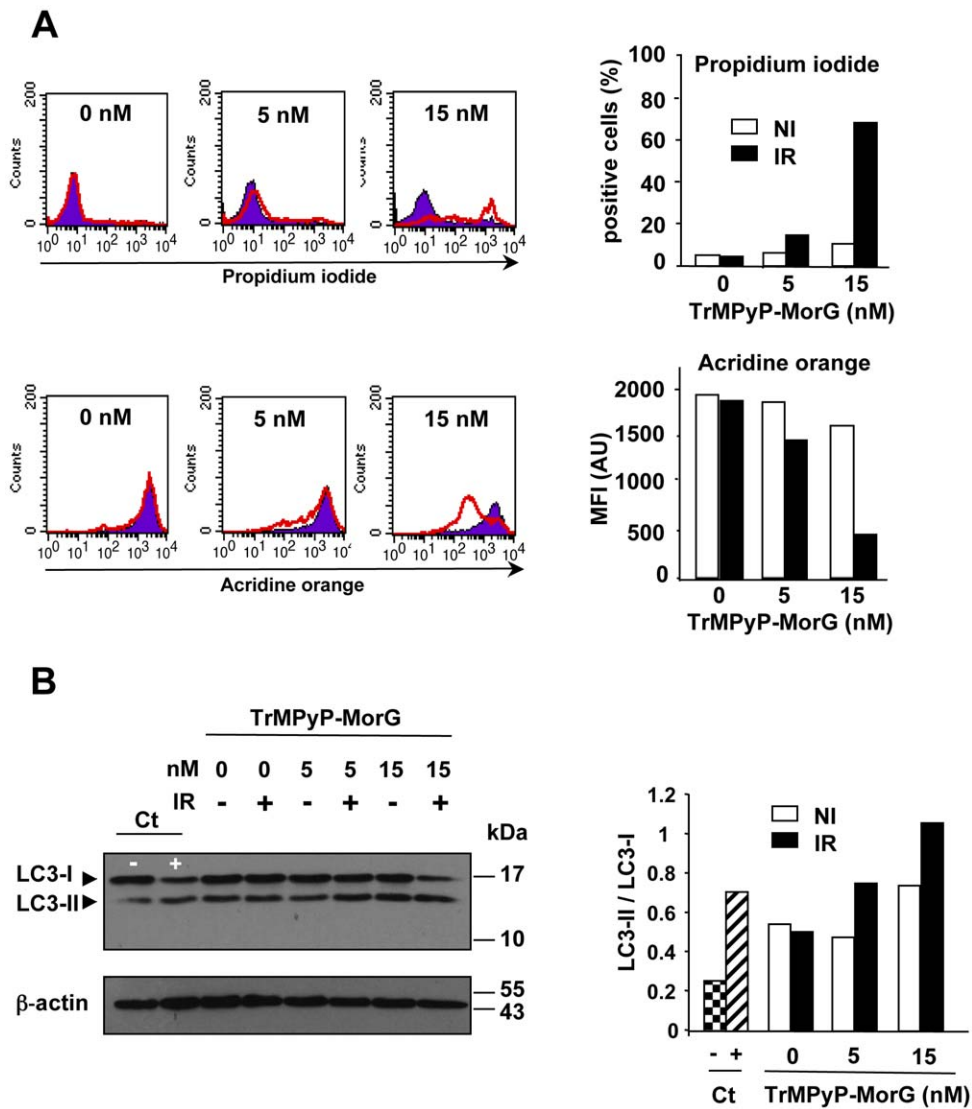
The present data demonstrate that plant lectins could serve as photosensitizer carrier proteins for the targeting of aberrant glycosylation on tumor cells and, with regard to antibodies, as an interesting additional weapon. Indeed, monoclonal antibodies are the most successful binding molecules in biomedicine, but their use is still limited in drug targeting, for instance by the difficulty and expensiveness of manufacturing, and the relative instability under conditions of covalent coupling with drug [29]. Conversely, the structure of plant lectins confers strong resistance to heat and chemical denaturing [12,13]. For instance, MorG presents a good thermodynamic stability, partially due to the absence of cysteines and consequently of disulfide bonds [30]. The extraction of the lectin from the bark of black mulberry tree is relatively simple and the chemical linkage with PS is easy. In addition, this lectin, as others, could be probably prepared by bioengineering [31]. Finally, such a coupling with plant lectin appears to be commercially realistic. With the aim to develop PS-targeting strategy, different immunoconjugates have previously been prepared between monoclonal antibodies [i.e., against colorectal antigens [32,33] or HER2 antigen [34,35]] and different PS molecules. Obviously, PS immunoconjugates are more selective for target cells than free PS, but can be less phototoxic on a per mole basis [34,36]. On the contrary, the TrMPyP-MorG conjugate used here strongly increased the PS phototoxicity, for instance at least of 1000 times on Jurkat leukemia cells. In addition, to our knowledge no conjugate has been prepared between a PS and a monoclonal antibody against T/Tn antigens. Yet, several anti-T and anti-Tn antibodies have been generated but with inconsistent results in their anti-tumor activities. A possible explanation is that previously prepared monoclonal antibodies recognize a conformational epitope constituted both by a peptide and an altered glycan, rather than the sole oligosaccharide moiety [10]. Consequently, these monoclonal antibodies can, at least partly, cross react with the target peptide on normal cells having a normal glycosylation. In contrast, some plant lectins, such as MorG have a high affinity for specific carbohydrate structure, independently of the peptide that carries the carbohydrate moiety structures. As altered glycans are over-expressed on tumor cells, plant lectins represent a powerful tool to discriminate between normal and cancer cells, by the mean of their cell surface binding to certain glycotopes, e.g. clusters of T/Tn antigens. Hence, our present data suggest that a plant lectin could be used as an efficient carrier for PS targeting, specifically into tumor cells expressing alterations of glycosylation, actually O-glycosylation. As other lectins, MorG recognizes different sets of glycotopes (high affinity to T and Tn structures), but can discriminate between subtle glycosylation modifications [14,15], for instance in the present work, alterations of cell surface glycoconjugates between leukemic and healthy T lymphocytes.

Our observations demonstrate for the first time that coupling a porphyrin with a plant lectin allows the selective elimination of leukemic cells mixed with healthy T cells, while fully preserving the functionality of normal T cells. Using different hematopoietic cell lines as well as primary lymphoid leukemia cells, the extent of cell death induced by treatment correlated with the level of MorG binding on target cells. Consequently, a useful tool to estimate the tumor sensitivity to conjugate-mediated cytotoxicity might be the



**Figure 5. Defects in the caspase signalling pathway do not protect from TrMPyP-MorG conjugate phototoxicity.** Parental Jurkat T cells (Jurkat), FADD-deficient ( $\Delta$  FADD), caspase 8- and 10-doubly deficient ( $\Delta$  casp 8–10) or caspase 9-deficient ( $\Delta$  casp 9) Jurkat cells ( $10^6$ /mL) were incubated with TrMPyP-MorG (5 or 15 nM) for 15 min at 37°C in the dark. After washing, cells were irradiated by white light (7.5 min, 1.7 J/cm<sup>2</sup>) and the cell viability was evaluated using MTT assay after 16 h incubation at 37°C in the dark. Results are means  $\pm$  SEM from 3–6 independent experiments,  $P^* < 0.05$  as compared to parental Jurkat T cells.

doi:10.1371/journal.pone.0023315.g005



**Figure 6. Induction of necrosis by TrMPyP-MorG conjugate.** Parental Jurkat T cells ( $10^6$ /mL) were incubated with TrMPyP-MorG (5 or 15 nM) for 15 min at  $37^\circ\text{C}$  in the dark. After washing, cells were irradiated (IR) or not (NI) by white light (7.5 min,  $1.7\text{ J/cm}^2$ ) and incubated 3–4 h at  $37^\circ\text{C}$  in the dark. **(A)** The cell viability was evaluated using PI staining, whereas the formation of acidic vesicular organelles (AVO) was assessed by using acridine orange. Cells were analyzed by flow cytometry excluding cell debris. Left, representative histograms: NI cells, full histograms; IR cells, empty histograms. Right, means of two independent experiments. **(B)** Left, representative Western blot to detect the conversion of LC3-I to LC3-II. Right, densitometry analysis; results are means of two independent experiments. Control cells (Ct) were cultured for 2 days either in RPMI medium containing 10% FCS (–) or HBSS medium (without amino acids and FCS) (+), a condition known to induce autophagy and AVO formation. doi:10.1371/journal.pone.0023315.g006

determination of the level of lectin binding at  $4^\circ\text{C}$  on the target cell surface. However, in spite of a FITC-MorG binding lower than in sensitive leukemic cell lines, some fresh lymphoid leukemia cells were sensitive to the conjugate-mediated phototoxicity, quite similarly to the sensitive established cell lines (Figure 3B). In addition, because cell lines with T lymphoid, B lymphoid or myeloid phenotype were similarly killed (Figure 3A), the present data suggest that the susceptibility of leukemia cells to conjugate-mediated toxicity is independent of the lymphoid or myeloid phenotypes. The degree of sensitivity of tumor cells might be related to the biochemical intracellular characteristics (such as intrinsic resistance mechanisms to cell death) rather than to the hematopoietic phenotype of leukemia cells. The results obtained with fresh leukemia samples suggest that, as compared to ALL cells, a higher binding of the lectin is required for killing CLL cells

by the MorG conjugate (Figure 3 and Figure S2). Because the increase of ROS concentration is an essential step for PCT-induced cell death using porphyrins [37], one possible explanation might be that the status of oxidative stress and/or antioxidant enzymes of ALL and CLL cells is different. ALL samples are characterized by a decrease of anti-oxidants (for instance, a decrease of catalase and superoxide dismutase activities [38,39]) and a sustained oxidative stress (due to a low NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 activity, known to attenuate oxidative stress [40], and/or aggressive chemotherapy protocols [38]). CLL are long-lived cells *in vivo*, developing clonal resistance to apoptosis through distinct mechanisms, such as overexpression of anti-apoptotic Bcl-2 family members [41,42]. CLL cells also appear to have a complex susceptibility to oxidative stress, being able to express and release catalase extracellularly [43].

Regarding the intracellular signaling mechanisms of TrMPyP-MorG-induced toxicity after light irradiation, a previous work indicates that cells quickly (5 min) took up the conjugate [16]. Whether only the internalized conjugate or, additionally, the cell surface bound conjugate contributes to cytotoxicity needs to be investigated. The present results suggest that caspase activation was not absolutely required for efficient cell death after light irradiation, as previously shown for Foscan<sup>®</sup>-mediated phototoxicity [44]. It is possible that the conjugate triggers, in the same cell, both caspase-independent and caspase-dependent events. Thus, the PARP-1 dependent cell death program can be triggered by ROS, independently of caspases [45,46]. In agreement with other previous observations concerning the mechanisms of cytotoxicity mediated by photoactivation of porphyrins or similar PS, treated target cells exhibited an increase in ceramide and ROS concentrations, two putative second messengers of cell death [47,48], which can be involved in caspase-dependent and caspase-independent cytotoxic processes [49]. The ROS are proposed as the main agents triggering the demise process of tumor cells after PDT [49]. They can kill tumor cells directly by apoptosis and/or necrosis [50]. In the present work, the TrMPyP-MorG-mediated phototoxicity was characterized by several necrosis features, such as caspase-independence and plasma membrane permeability. In addition, the decrease of AO staining induced by TrMPyP-MorG treatment might be due to lysosomal disruption, in agreement with recent data indicating that necrotic cell death can be characterized by irreversible lysosomal permeabilization [51]. The elevated level of LC3-II we observed might be compatible with a necrotic process since necrosis-initiating insults can result in activation of autophagy [52]. Thus, a main mechanism for TrMPyP-MorG-mediated phototoxicity could be a necrotic cell death, at least in Jurkat T cells. It is tempting to speculate that irradiation of TrMPyP-MorG-treated cells might induce a strong oxidative stress that triggers lysosomal membrane rupture and subsequent necrosis, as proposed for neuronal death [52]. Finally, taken together, our data suggest that PCT-induced toxicity using TrMPyP-MorG can bypass the caspase pathway to trigger cell death. This might be a valuable advantage over apoptosis-inducing agents, since tumor cells often resist caspase-dependent cell death [53].

ECP is currently used for treating T lymphoma (Sezary lymphoma). This PCT method uses UV-A radiation and non-targeted PS (psoralen) but does not preserve the healthy leukocytes that are mixed with the malignant lymphocytes. The efficiency and selectivity of PCT we observed using TrMPyP-MorG on a mixture of leukemic and healthy cells suggest that this type of conjugate could be advantageously employed in ECP against some chronic hematopoietic malignancies. Indeed, the use of such white-light activatable PS can allow lymphocyte preservation because: *i*) the PS is targeted to cells exhibiting abnormal glycosylation; *ii*) white-light is surely less toxic than UV on healthy lymphocytes. Consequently, the new approach we describe could be used in order to reduce the tumor mass and protect healthy lymphocytes, preserving the ability of anti-tumor immune response. Indeed, re-infusion of PCT-treated leukemic cells might trigger auto-vaccination mechanisms [1,3,5]. In addition, the level of Tn antigen expression and of MorG binding was significantly higher on activated T lymphocytes than on resting T lymphocytes (Figure S3), suggesting that PS-MorG conjugates might be used to eliminate abnormal activated-lymphocytes by ECP. Indeed, increasing amounts of observations indicate that ECP can be useful to treat patients with autoimmune diseases or with chronic graft versus host disease, which are all characterized by the presence of abnormal activated-T cells [54].

In conclusion, whereas further *in vivo* experiments need to be performed to document the efficiency of the PS-lectin conjugate, the present observations demonstrate the potential of plant lectins to target glycan alterations on tumor cells and to enhance the delivery of photosensitizers in PCT *in vitro*, e.g. in ECP and potentially in PDT. Plant lectins might also be used to increase PDT efficiency against solid tumors, such as T/Tn positive epithelial tumor cells. In addition, some plant lectins have specific affinity for binding to the inflamed or non-inflamed endothelial cells [55]. As targeting in PDT is mainly achieved today through precise application of the light, conjugation of PS with a lectin able to target tumor vasculature could enhance the efficiency of this treatment in oncology.

## Supporting Information

**Figure S1 Toxicity of free MorG.** Jurkat T cells ( $10^6$ /mL) were exposed to various concentrations of MorG (from 5 to 5000 nM) for 15 min at 37°C, then washed. Cells were irradiated (**IR**) or not (**NI**) as indicated in material and methods. Cell viability was evaluated using MTT assay after 24 h of culture. Results are means  $\pm$  SD of 3 independent experiments. The rectangle corresponds to range of concentrations used for the evaluation of conjugate phototoxicity in the present work. \*  $P < 0.05$ , as compared to 5 or 100 nM TrMPyP-MorG. (TIF)

**Figure S2 The toxic effect of conjugate on fresh primary leukemia cells was confirmed using annexin V-FITC/PI staining and flow cytometry analysis.** Fresh samples from patients with acute (**ALL**) or chronic (**CLL**) lymphoid leukemia were treated with TrMPyP-MorG and white light ( $1.7 \text{ J/cm}^2$ ), as indicated in Figure 3. When the sample size permitted, the cell viability was determined 3–4 hours after irradiation using AnnexinV-FITC/PI staining and analysis by flow cytometry (in gate R1, defined to exclude cell debris from the analysis or in gate R2 defined as containing apparently viable cells, i.e. corresponding to normal morphology of lymphocytes and lymphoblastes, in size and granularity). (**A** and **B**) Representative experiment analysis of a CLL sample : (**A**) in gate R1 and (**B**) in gate R2. Some fresh samples contained relatively high proportion of dead cells, but allowed evaluation of conjugate-induced cell death from the percentage determination of viable cells (defined as AnnexinV-FITC and PI negative cells). (**C** and **D**) Correlation between lectin binding and phototoxic effect after treatment with 15 nM or 30 nM TrMPyP-MorG of fresh primary ALL and CLL from four and three different patients, respectively. Results are the means of duplicate determination for each leukemia samples in gate R2. (TIF)

**Figure S3 Comparative binding of MorG on resting T lymphocytes and activated-T lymphocytes.** T lymphocytes isolated from healthy donors were incubated for 48 h with anti-CD3 and anti-CD28 monoclonal antibodies and lymphocyte activation was controlled using staining with anti-CD25 monoclonal antibody. Activated T cells, resting T cells from the same donor and Jurkat T cells were incubated with FITC-MorG (0.25  $\mu\text{g/mL}$ ) or anti-CD175 (anti-Tn) monoclonal antibody. (**A**) Representative experiment, autofluorescence: full histograms, positive fluorescence : empty histograms. (**B**) Mean fluorescence intensity (MFI) was measured. Results for MorG staining are shown, means of three experiments, Auto = autofluorescence, \* $P < 0.05$  between resting and activated T cells. (TIF)

## Acknowledgments

We thank Drs. L. Astudillo, J.X. Corberand and P. Laharrague and C. Demur (Hospitals of Toulouse) for providing the leukemic samples. We thank M.D. Pinteaux and C. Teisseire for their technical assistance.

## References

- Oliven A, Shechter Y (2001) Extracorporeal photopheresis: a review. *Blood Rev* 15: 103–108.
- Dolmans DE, Fukumura D, Jain RK (2003) Photodynamic therapy for cancer. *Nat Rev Cancer* 3: 380–387.
- Kabingu E, Oseroff AR, Wilding GE, Gollnick SO (2009) Enhanced systemic immune reactivity to a Basal cell carcinoma associated antigen following photodynamic therapy. *Clin Cancer Res* 15: 4460–4466.
- Castano AP, Mroz P, Hamblin MR (2006) Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nat Rev Cancer* 6: 535–545.
- Korbelik M, Stott B, Sun J (2007) Photodynamic therapy-generated vaccines: relevance of tumour cell death expression. *Br J Cancer* 97: 1381–1387.
- del Carmen MG, Rizvi I, Chang Y, Moor AC, Oliva E, et al. (2005) Synergism of epidermal growth factor receptor-targeted immunotherapy with photodynamic treatment of ovarian cancer in vivo. *J Natl Cancer Inst* 97: 1516–1524.
- Cao Y, Merling A, Karsten U, Goletz S, Punzel M, et al. (2008) Expression of CD175 (Tn), CD175s (sialosyl-Tn) and CD176 (Thomsen-Friedenreich antigen) on malignant human hematopoietic cells. *Int J Cancer* 123: 89–99.
- Itzkowitz SH, Yuan M, Montgomery CK, Kjeldsen T, Takahashi HK, et al. (1989) Expression of Tn, sialosyl-Tn, and T antigens in human colon cancer. *Cancer Res* 49: 197–204.
- Heimburg-Molinari J, Almogren A, Morey S, Glinskii OV, Roy R, et al. (2009) Development, characterization, and immunotherapeutic use of peptide mimics of the Thomsen-Friedenreich carbohydrate antigen. *Neoplasia* 11: 780–792.
- Brooks CL, Schietinger A, Borisova SN, Kufer P, Okon M, et al. (2010) Antibody recognition of a unique tumor-specific glycopeptide antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 10056–10061.
- Shan L (2004–2009) [Biotinylated anti-Tn MLS128 monoclonal antibody-125I-streptavidin]. In *Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD)* [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US).
- Liu B, Bian HJ, Bao JK (2010) Plant lectins: potential anticancer drugs from bench to clinic. *Cancer Lett* 287: 1–12.
- Wu AM, Lisowska E, Duk M, Yang Z (2009) Lectins as tools in glycoconjugate research. *Glycoconj J* 26: 899–913.
- Benoist H, Culerrier R, Poiroux G, Segui B, Jauneau A, et al. (2009) Two structurally identical mannose-specific jacalin-related lectins display different effects on human T lymphocyte activation and cell death. *J Leukoc Biol* 86: 103–114.
- Singh T, Wu JH, Peumans WJ, Rouge P, Van Damme EJ, et al. (2007) Recognition profile of *Morus nigra* agglutinin (Morniga G) expressed by monomeric ligands, simple clusters and mammalian polyvalent glycotopes. *Mol Immunol* 44: 451–462.
- Poiroux G, Pitié M, Culerrier R, Ségui B, Van Damme EJ, et al. (2010) Morniga G: a plant lectin as an endocytic ligand for photosensitizer molecule targeting towards tumor-associated T/Tn antigens. *Photochem Photobiol* In Publication.
- Nyman ES, Hynninen PH (2004) Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B* 73: 1–28.
- Milhas D, Cuvillier O, Therville N, Clave P, Thomsen M, et al. (2005) Caspase-10 triggers Bid cleavage and caspase cascade activation in FasL-induced apoptosis. *J Biol Chem* 280: 19836–19842.
- Casas C, Saint-James B, Loup C, Lacey C, Meunier B (1993) Synthesis of cationic metalloporphyrin precursors related to the design of DNA cleavers. *J Org Chem* 58: 2913–2917.
- Chen Y, Azad MB, Gibson SB (2009) Superoxide is the major reactive oxygen species regulating autophagy. *Cell Death Differ* 16: 1040–1052.
- Alcouffé J, Therville N, Segui B, Nazzari D, Blaes N, et al. (2004) Expression of membrane-bound and soluble FasL in Fas- and FADD-dependent T lymphocyte apoptosis induced by mildly oxidized LDL. *FASEB J* 18: 122–124.
- Lafont E, Milhas D, Carpentier S, Garcia V, Jin ZX, et al. (2009) Caspase-mediated inhibition of sphingomyelin synthesis is involved in FasL-triggered cell death. *Cell Death Differ*.
- Chen Y, Azad MB, Gibson SB (2010) Methods for detecting autophagy and determining autophagy-induced cell death. *Can J Physiol Pharmacol* 88: 285–295.
- Negre-Salvayre A, Auge N, Duval C, Robbesyn F, Thiers JC, et al. (2002) Detection of intracellular reactive oxygen species in cultured cells using fluorescent probes. *Methods Enzymol* 352: 62–71.
- Van Veldhoven PP, Matthews TJ, Bolognesi DP, Bell RM (1992) Changes in bioactive lipids, alkylacylglycerol and ceramide, occur in HIV-infected cells. *Biochem Biophys Res Commun* 187: 209–216.
- Toscano MA, Bianco GA, Ilarregui JM, Croci DO, Correale J, et al. (2007) Differential glycosylation of TH1, TH2 and TH-17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death. *Nat Immunol* 8: 825–834.

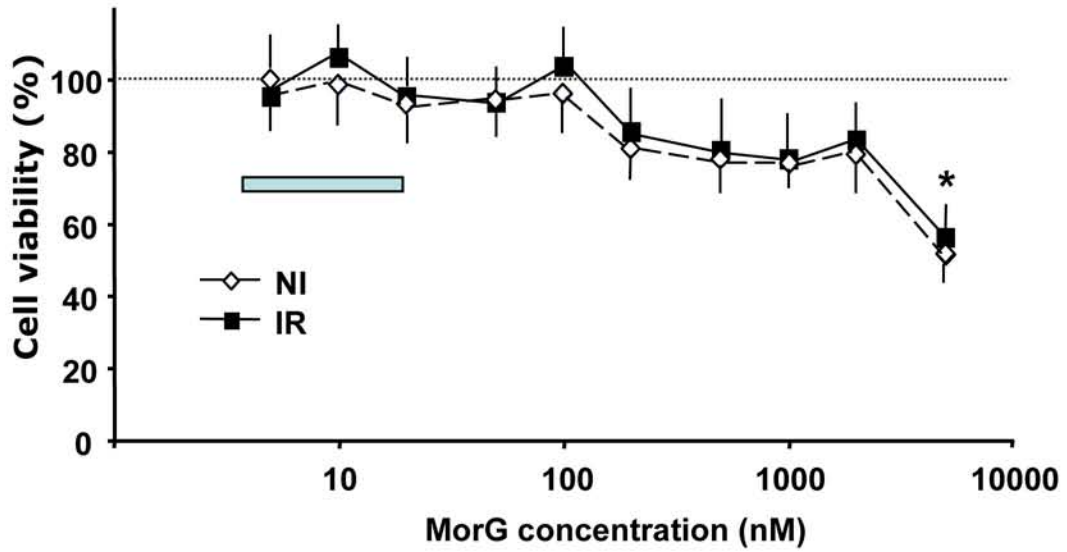
## Author Contributions

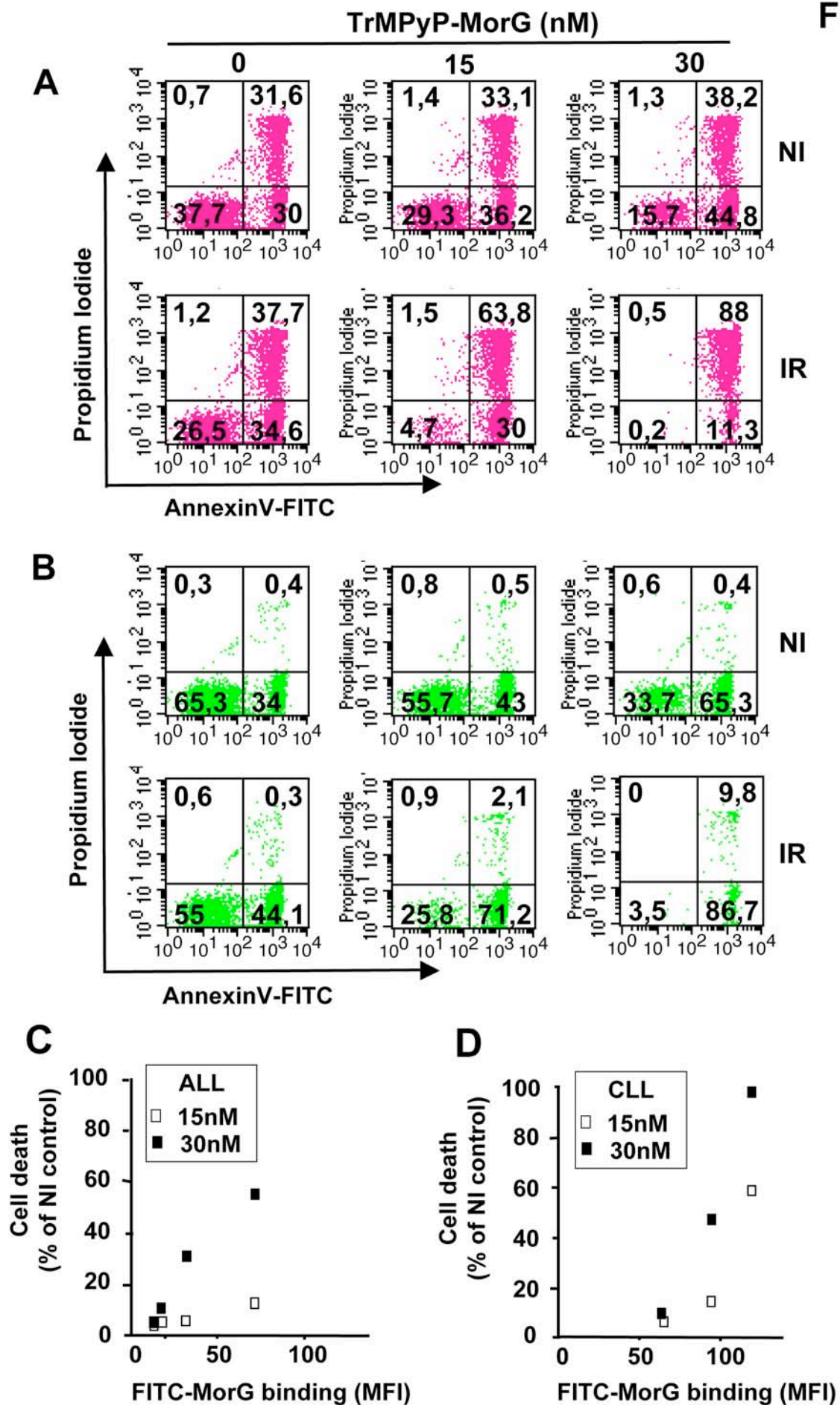
Conceived and designed the experiments: HB GP. Performed the experiments: GP RC EL. Analyzed the data: HB GP BS PR TL EL. Contributed reagents/materials/analysis tools: BS TL HB MP JB EVD WP AB PR EL. Wrote the paper: HB GP TL BS. Experiments on Figure 6: EL.

- Ohtsubo K, Marth JD (2006) Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell* 126: 855–867.
- Piller V, Piller F, Fukuda M (1990) Biosynthesis of truncated O-glycans in the T cell line Jurkat. Localization of O-glycan initiation. *J Biol Chem* 265: 9264–9271.
- Binz HK, Amstutz P, Pluckthun A (2005) Engineering novel binding proteins from nonimmunoglobulin domains. *Nat Biotechnol* 23: 1257–1268.
- Van Damme EJ, Hause B, Hu J, Barre A, Rouge P, et al. (2002) Two distinct jacalin-related lectins with a different specificity and subcellular location are major vegetative storage proteins in the bark of the black mulberry tree. *Plant Physiol* 130: 757–769.
- Lam SK, Ng TB (2010) Lectins: production and practical applications. *Appl Microbiol Biotechnol*.
- Del Governatore M, Hamblin MR, Piccinini EE, Ugolini G, Hasan T (2000) Targeted photodestruction of human colon cancer cells using charged 17.1A chlorin e6 immunoconjugates. *Br J Cancer* 82: 56–64.
- Hamblin MR, Del Governatore M, Rizvi I, Hasan T (2000) Biodistribution of charged 17.1A photoimmunoconjugates in a murine model of hepatic metastasis of colorectal cancer. *Br J Cancer* 83: 1544–1551.
- Savellano MD, Pogue BW, Hoopes PJ, Vitetta ES, Paulsen KD (2005) Multiepitope HER2 targeting enhances photoimmunotherapy of HER2-overexpressing cancer cells with pyropheophorbide-a immunoconjugates. *Cancer Res* 65: 6371–6379.
- Serebrovskaya EO, Edelweiss EF, Stremovskiy OA, Lukyanov KA, Chudakov DM, et al. (2009) Targeting cancer cells by using an antireceptor antibody-photosensitizer fusion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 9221–9225.
- Savellano MD, Hasan T (2005) Photochemical targeting of epidermal growth factor receptor: a mechanistic study. *Clin Cancer Res* 11: 1658–1668.
- Price M, Reiners JJ, Santiago AM, Kessel D (2009) Monitoring singlet oxygen and hydroxyl radical formation with fluorescent probes during photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* 85: 1177–1181.
- Mazor D, Abucoider A, Meyerstein N, Kapelushnik J (2008) Antioxidant status in pediatric acute lymphocytic leukemia (ALL) and solid tumors: the impact of oxidative stress. *Pediatr Blood Cancer* 51: 613–615.
- Battisti V, Maders LD, Bagatini MD, Santos KF, Spanevello RM, et al. (2008) Measurement of oxidative stress and antioxidant status in acute lymphoblastic leukemia patients. *Clin Biochem* 41: 511–518.
- Smith MT, Wang Y, Kane E, Rollinson S, Wiemels JL, et al. (2001) Low NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 activity is associated with increased risk of acute leukemia in adults. *Blood* 97: 1422–1426.
- Shanafelt TD, Lee YK, Bone ND, Strega AK, Narayanan VL, et al. (2005) Adaphostin-induced apoptosis in CLL B cells is associated with induction of oxidative stress and exhibits synergy with fludarabine. *Blood* 105: 2099–2106.
- Samuel S, Tumilasci VF, Olieri S, Nguyen TL, Shamy A, et al. VSV oncolysis in combination with the BCL-2 inhibitor obatoclax overcomes apoptosis resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Mol Ther* 18: 2094–2103.
- Moran EC, Kamiguti AS, Cawley JC, Pettitt AR (2002) Cytoprotective antioxidant activity of serum albumin and autocrine catalase in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 116: 316–328.
- Kessel D, Luo Y (1999) Photodynamic therapy: a mitochondrial inducer of apoptosis. *Cell Death Differ* 6: 28–35.
- Hong SJ, Dawson TM, Dawson VL (2004) Nuclear and mitochondrial conversations in cell death: PARP-1 and AIF signaling. *Trends Pharmacol Sci* 25: 259–264.
- Vittar NB, Awruch J, Azizuddin K, Rivarola V (2010) Caspase-independent apoptosis, in human MCF-7c3 breast cancer cells, following photodynamic therapy, with a novel water-soluble phthalocyanine. *Int J Biochem Cell Biol* 42: 1123–1131.
- Copley L, van der Watt P, Wirtz KW, Parker MI, Leaner VD (2008) Photolon, a chlorin e6 derivative, triggers ROS production and light-dependent cell death via necrosis. *Int J Biochem Cell Biol* 40: 227–235.
- Separovic D, Bielawski J, Pierce JS, Merchant S, Tarca AL, et al. (2009) Increased tumour dihydroceramide production after Photofrin-PDT alone and improved tumour response after the combination with the ceramide analogue LCL29. Evidence from mouse squamous cell carcinomas. *Br J Cancer* 100: 626–632.
- Buytaert E, Dewaele M, Agostinis P (2007) Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochim Biophys Acta* 1776: 86–107.
- Marchal S, Fadloun A, Maugain E, D’Hallewin MA, Guillemin F, et al. (2005) Necrotic and apoptotic features of cell death in response to Foscan

- photosensitization of HT29 monolayer and multicell spheroids. *Biochem Pharmacol* 69: 1167–1176.
51. Giusti C, Luciani MF, Klein G, Aubry L, Tresse E, et al. (2009) Necrotic cell death: From reversible mitochondrial uncoupling to irreversible lysosomal permeabilization. *Exp Cell Res* 315: 26–38.
  52. Yamashima T, Oikawa S (2009) The role of lysosomal rupture in neuronal death. *Prog Neurobiol* 89: 343–358.
  53. Fadeel B, Ottosson A, Pervaiz S (2008) Big wheel keeps on turning: apoptosome regulation and its role in chemoresistance. *Cell Death Differ* 15: 443–452.
  54. Chen BJ, Cui X, Liu C, Chao NJ (2002) Prevention of graft-versus-host disease while preserving graft-versus-leukemia effect after selective depletion of host-reactive T cells by photodynamic cell purging process. *Blood* 99: 3083–3088.
  55. Thurston G, Murphy TJ, Baluk P, Lindsey JR, McDonald DM (1998) Angiogenesis in mice with chronic airway inflammation: strain-dependent differences. *Am J Pathol* 153: 1099–1112.

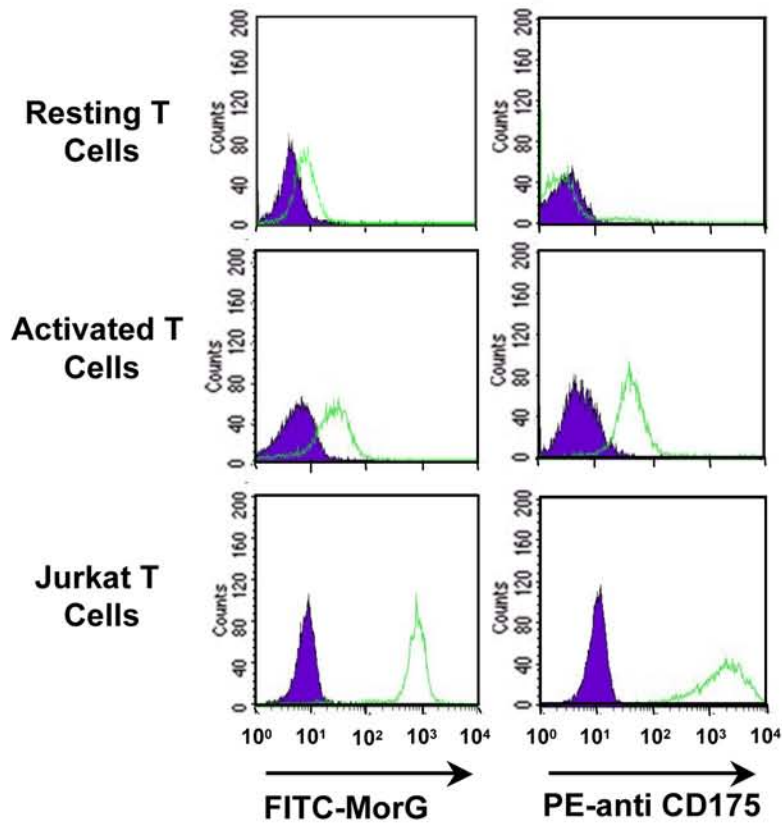
Figure S1







A



B

Cells	Auto	MorG binding
Resting T Cells	3.5 ± 1	6 ± 3
Activated T Cells	6 ± 1	43 ± 12 <sup>*</sup>
Jurkat T Cells	10 ± 1	695 ± 97



### **Figure S1: Toxicity of free MorG.**

Jurkat T cells ( $10^6$ /mL) were exposed to various concentrations of MorG (from 5 to 5000 nM) for 15 min at 37°C, then washed. Cells were irradiated (**IR**) or not (**NI**) as indicated in material and methods. Cell viability was evaluated using MTT assay after 24h of culture. Results are means  $\pm$  SD of 3 independent experiments. The rectangle corresponds to range of concentrations used for the evaluation of conjugate phototoxicity in the present work.

\*  $P < 0.05$ , as compared to 5 or 100 nM TrMPyP-MorG.

### **Figure S2: The toxic effect of conjugate on fresh primary leukemia cells was confirmed using annexin V-FITC/PI staining and flow cytometry analysis.**

Fresh samples from patients with acute (**ALL**) or chronic (**CLL**) lymphoid leukemia were treated with TrMPyP-MorG and white light ( $1.7 \text{ J/cm}^2$ ), as indicated in Figure 3. When the sample size permitted, the cell viability was determined 3-4 hours after irradiation using AnnexinV-FITC/PI staining and analysis by flow cytometry (in gate R1, defined to exclude cell debris from the analysis or in gate R2 defined as containing apparently viable cells, i.e. corresponding to normal morphology of lymphocytes and lymphoblastes, in size and granularity). (**A** and **B**) Representative experiment analysis of a CLL sample : (**A**) in gate R1 and (**B**) in gate R2. Some fresh samples contained relatively high proportion of dead cells, but allowed evaluation of conjugate-induced cell death from the percentage determination of viable cells (defined as AnnexinV-FITC and PI negative cells). (**C** and **D**) Correlation between lectin binding and phototoxic effect after treatment with 15 nM or 30 nM TrMPyP-MorG of fresh primary ALL and CLL from four and three different patients, respectively. Results are the means of duplicate determination for each leukemia samples in gate R2.

**Figure S3 : Comparative binding of MorG on resting T lymphocytes and activated-T lymphocytes.**

T lymphocytes isolated from healthy donors were incubated for 48h with anti-CD3 and anti-CD28 monoclonal antibodies and lymphocyte activation was controlled using staining with anti-CD25 monoclonal antibody. Activated T cells, resting T cells from the same donor and Jurkat T cells were incubated with FITC-MorG (0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) or anti-CD175 (anti-Tn) monoclonal antibody. **(A)** Representative experiment, autofluorescence : full histograms, positive fluorescence : empty histograms. **(B)** Mean fluorescence intensity (MFI) was measured. Results for MorG staining are shown, means of three experiments, Auto = autofluorescence, \* $P < 0.05$  between resting and activated T cells.

### III-2-1-4 Discussion des articles 3 et 4 :

#### *III-2-1-4 -1 Spécificité de reconnaissance et endocytose de MorG (Article 3) :*

Les cellules leucémiques lymphoïdes T Jurkat sont déficientes en  $\beta$ 1-3Galactosyl-tranférase et expriment fortement l'antigène Tn [59], tandis que les lymphocytes T sains ne l'expriment pas. Dans nos conditions d'analyse (MorG-FITC : 30 min de contact à 0,125  $\mu$ g/ml), et de façon analogue à un anticorps monoclonal anti-Tn, la lectine MorG se lie fortement aux cellules Jurkat et non aux lymphocytes T sains. Cependant, à la différence du MAb, une certaine activité de MorG est évidemment possible avec les lymphocytes T, expliquant par exemple la possibilité d'activation lymphocytaire. Le ciblage par MorG reste donc relatif. Des expériences d'inhibition par des glycanes, des glycoconjugués *O*-liés (comme par exemple, l'antigène Tn et certaines mucines) ou des anticorps anti-Tn en solution montrent que la lectine interagit avec les antigènes Tn présents à la surface des cellules Jurkat. Des expériences de microscopie confocale et de cytométrie de flux mettent en évidence une endocytose rapide (5 minutes) et *O*-glycane-spécifique de MorG dans les cellules Jurkat. Ces résultats démontrent la spécificité de reconnaissance de la lectine pour les antigènes Tn et sa capacité à pénétrer facilement dans des cellules leucémiques.

Des conjugués (TrMPyP-MorG) associant de façon covalente la lectine à un PS (TrMPyP pour triméthylphényl-porphyrine), activable en lumière visible ( $\lambda_{exc_{max}} \text{ TrMPyP} = 434 \text{ nm}$ ), ont été préparés. Leur caractérisation moléculaire a été réalisée par spectrométrie de masse. Un conjugué avec un ratio 1:1 (lectine:porphyrine) a été sélectionné en raison de la conservation parfaite de sa capacité de reconnaissance spécifique des sucres après couplage et de l'absence d'agrégation spontanée en solution. Les expériences de microscopie confocale et de cytométrie en flux ont mis en évidence une endocytose rapide et *O*-glycane-spécifique du conjugué TrMPyP-MorG dans les cellules Jurkat, confirmant le maintien de la spécificité de reconnaissance glycanique et le maintien probable de la capacité d'endocytose de la lectine.

#### *III-2-1-4 -2 Evaluation de l'efficacité toxique du conjugué TrMPyP-MorG en PCT (Article 3) :*

La toxicité du conjugué a ensuite été évaluée *in vitro* dans des expériences de PCT (irradiation dans le visible) vis-à-vis des cellules Jurkat et des lymphocytes T sains. En l'absence d'irradiation lumineuse (lumière visible 400-800 nm), aucune toxicité n'est observée

pour des concentrations jusqu'à 5  $\mu$ M. Après photoactivation, le couplage covalent de TrMPyP à MorG permet d'augmenter la toxicité de TrMPyP d'un facteur 3000 ( $DL_{50} \text{ TrMPyP-MorG} = 5 \text{ nM}$  ;  $DL_{50} \text{ TrMPyP} = 15 \mu\text{M}$ ). Des expériences d'inhibition par des glycoconjugués en solution démontrent que cette cytotoxicité est *O*-glycane-dépendante. De plus, la cytotoxicité du conjugué TrMPyP-MorG a été évaluée sur des lymphocytes T sains. Ceux-ci sont Tn négatifs et résistent à la phototoxicité induite par le conjugué.

#### *III-2-1-4-3 Evaluation de l'efficacité du ciblage de PS par MorG (Article 4):*

Afin d'évaluer l'efficacité de ciblage du conjugué TrMPyP-MorG, sa toxicité a été évaluée en PCT sur un mélange 1:1 de cellules Jurkat et de lymphocytes T sains. Le conjugué permet l'élimination spécifique des cellules leucémiques et le maintien de la viabilité et des fonctions des lymphocytes T, les lymphocytes T sains restant activables (par l'Il-2, un anticorps anti-CD3 et un anticorps anti-CD28) après PCT.

En fonction de la capacité de liaison de la lectine à la surface cellulaire, le conjugué TrMPyP-MorG est utilisable contre des cellules leucémiques variées (pour TrMPyP-MorG 15 nM et par sensibilité décroissante à la phototoxicité: Jurkat (lignée lymphoïde T) > KG1a (lignée myéloïde) > Molt-4 (lignée lymphoïde T) > EBV (lignée lymphoblastoïde B) > KG1 (lignée myéloïde) > SKW6.4 (lignée lymphoblastoïde B) > CEM (lignée lymphoïde T) > HL60 (lignée myéloïde) > Lymphome T de Sézary HuT-78 > K562 (lignée myéloïde) > U-937 (lignée myéloïde)), mais également contre des cellules leucémiques primaires provenant de patients atteints de leucémies lymphoïdes aiguës ou chroniques. La sensibilité des différentes cellules tumorales au conjugué TrMPyP-MorG est corrélée avec le niveau d'interaction de la lectine à la surface des cellules.

Enfin, la phototoxicité induite par le conjugué après irradiation semble dépendre de la dose de conjugué. Alors qu'à la DL50, le conjugué entraîne une signalisation apoptotique faisant intervenir la caspase initiateur 9, la DL100 entraîne une mort cellulaire nécrotique. Il est ainsi possible de moduler la mort cellulaire afin d'optimiser l'efficacité du traitement [325].

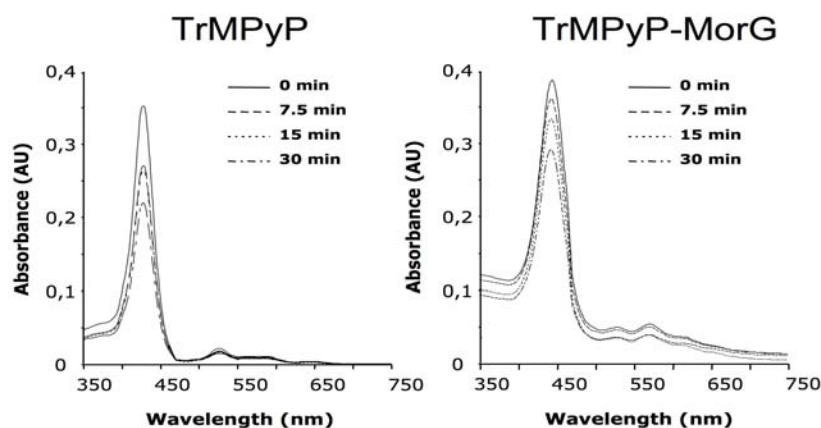
#### *III-2-1-4-4 Discussion :*

Les résultats suggèrent que le couplage covalent de PS, et notamment de porphyrine, sur des lectines végétales est réalisable puisqu'il ne perturbe ni l'endocytose ni la spécificité de reconnaissance glycanique de la lectine et augmente fortement l'activité phototoxique du PS. Pour l'instant, le couplage de PS n'a été réalisé que sur des protéines ayant une faible

capacité de ciblage, comme par exemple l'albumine [292] et la transferrine [294], ou sur des molécules ayant une plus grande sélectivité, tels que les peptides [298] ou les anticorps monoclonaux [284]. Ces derniers semblent être très prometteurs dans le cadre du ciblage de cellules pathologiques mais certains inconvénients persistent. Lors du couplage covalent de PS, la plupart des conjugués PS-MAb présentent une diminution de l'activité de ciblage (c'est-à-dire une baisse de l'affinité de l'anticorps pour son antigène) et/ou de l'activité phototoxique. De plus, les MAbs sont très sensibles, contrairement aux lectines végétales, à la réduction et à l'élévation de la température, ce qui diminue leur durée de stockage. Leur coût de production est également plus élevé que celui des lectines végétales.

La grande stabilité de MorG permet un couplage covalent de PS. Les conjugués obtenus permettent au PS de pénétrer plus rapidement et vraisemblablement en plus grande quantité dans les cellules cibles, conduisant à un effet phototoxique très élevé. De plus, comme le suggère les expériences de photoblanchiment, le couplage pourrait prévenir la photodégradation du PS (*Fig. 34*). De plus, MorG est spécifique des antigènes glycaniques T et Tn qui sont associés aux cellules tumorales, et notamment aux cellules leucémiques. Ainsi, MorG interagit préférentiellement avec des lymphocytes T leucémiques comparativement à des lymphocytes T sains. Cet atout permet au conjugué TrMPyP-MorG d'induire une phototoxicité préférentiellement sur les lymphocytes leucémiques ( $\geq 90$  % de toxicité sur les lymphocytes leucémiques et  $\leq 10$  % de toxicité sur les lymphocytes sains), permettant un ciblage relatif suffisant pour éliminer préférentiellement des lymphocytes T leucémiques en mélange avec des lymphocytes T sains.

Pour l'instant, aucun moyen de ciblage n'a été étudié dans le cadre de l'ECP. Son principe est d'induire de la toxicité indifféremment sur les cellules saines et pathologiques. Les cellules pathologiquement actives étant plus sensibles au traitement ECP (Psoralène + UV-A) [209,210]. La réinjection des cellules mortes est à l'origine de l'effet vaccinant. Aussi, ce type de conjugué (PS-lectine), en conservant la viabilité des cellules saines, pourrait permettre d'améliorer l'efficacité de l'ECP et d'élargir son utilisation à tous types de leucémies surexprimant des TACAs. En effet, en clinique, seuls certains lymphomes T sont actuellement traités par ECP [190]. Ce type de protocole appliqué dans des conditions de préservation des leucocytes sains pourrait être encore plus favorable.



**Figure 34 :** Photoblanchiment de la porphyrine TrMPyP liée ou non à MorG. (A) Absorbance de la porphyrine après irradiation en lumière blanche. (B) Pourcentage de photoblanchiment (n = 3).

Nos résultats suggèrent que, grâce à la lectine, la présence de faible concentration de conjugué PS-lectine dans le milieu extracellulaire de la tumeur peut suffire à atteindre une toxicité très élevée. Une évaluation de l'efficacité de ce type de conjugué en PDT, c'est-à-dire contre des tumeurs solides T/Tn positives, ou pour traiter des métastases (par exemple des tumeurs intrapéritonéales [326]), est indispensable, puisque certaines localisations tumorales rendent le ciblage endoscopique aléatoire et oblige l'irradiation de tissus sains.

### **III-2-2 Evaluation du ciblage de PS adaptés au traitement de tumeurs solides**

#### **III-2-2-1 Introduction de l'article 5 :**

Les longueurs d'onde pour lesquelles les chromophores endogènes de l'organisme d'un patient absorbent peu de lumière sont celles situées dans le rouge. De plus, à ces longueurs d'onde (600-800 nm), les photons pénètrent en profondeur dans les tissus (5 à 10 mm). En raison de ces deux caractéristiques, la lumière rouge est plus adaptée au traitement PDT de tumeurs solides. Les PS présentent des spectres d'absorbance caractéristiques,

constitués d'une bande d'absorbance dans les longueurs d'onde de la lumière bleue (400-450 nm) appelée bande de Soret et de bandes d'absorbance secondaires (500-800 nm) appelées bandes Q. La longueur d'onde d'absorption et l'amplitude de la bande de Soret varie selon la structure chimique des PS (*Fig. 15*). Ainsi, les porphyrines sont des molécules qui présentent une absorbance maximale autour des 400 nm (par exemple, 434 nm pour TrMPyP et 414 nm pour TPPS [*meso*-tetra(4-sulfonatophenyl)porphyrin], dans le PBS), alors que les Phtalocyanines et chlorines présentent deux bandes d'absorption (par exemple, 356 et 672 nm pour l'AlPcS4 [Al(III)-tetrasulfonatophthalocyanine], et, 400 et 656 nm pour la Chle6 [Chlorine e6], dans le PBS), faisant de ces PS des molécules utilisables dans le rouge. L'absorbance de AlPcS4 est maximale à 672 nm ( $\epsilon_{356\text{nm}} = 8.10^4 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$  ;  $\epsilon_{672\text{nm}} = 19.10^4 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ) alors que celle de la chle6 est maximale au niveau de la bande de Soret ( $\epsilon_{400\text{nm}} = 15.10^4 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$  ;  $\epsilon_{656\text{nm}} = 4.10^4 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ), faisant de l'AlPcS4 une molécule photosensible très bien adaptée au traitement de tumeurs solides.

Ainsi, des conjugués associant ces différents PS (porphyrines cationique (TrMPyP) ou anionique (TPPS), ou des PS non chargés (phtalocyanine et chlorine)) à la lectine végétale MorG ont été préparés, caractérisés et leur phototoxicité respective a été évaluée sur la lignée cellulaire leucémique Jurkat. Nous avons choisi ces PS en raison de leurs différences physicochimiques. Les porphyrines anioniques sont connues pour être plus difficilement internalisées que les cationiques [327], les rendant, à des doses équivalentes, moins toxiques que les cationiques. Le couplage à la lectine pourrait diminuer la différence de toxicité entre TPPS et TrMPyP. La chlorine et la phtalocyanine ont été sélectionnées en raison de leurs caractéristiques spectrales (activables dans le rouge) et du fait qu'elles sont non chargées.





**III-2-2-2 Article 5 : Comparative Study of the Phototoxicity of Long-Wavelength Photosensitizers Targeted by the MornigaG Lectin**



## Comparative Study of the Phototoxicity of Long-Wavelength Photosensitizers Targeted by the MornigaG Lectin

Emi Evangelio,<sup>†,‡</sup> Guillaume Poiroux,<sup>‡,§</sup> Raphaël Culerrier,<sup>§</sup> Geneviève Pratviel,<sup>†</sup> Els J. M. Van Damme,<sup>#</sup> Willy J. Peumans,<sup>#</sup> Annick Barre,<sup>‡</sup> Pierre Rougé,<sup>‡</sup> Hervé Benoist,<sup>§</sup> and Marguerite Pitie<sup>\*,†</sup>

<sup>†</sup>CNRS, LCC (Laboratoire de Chimie de Coordination), 205 route de Narbonne, 31077 Toulouse, France

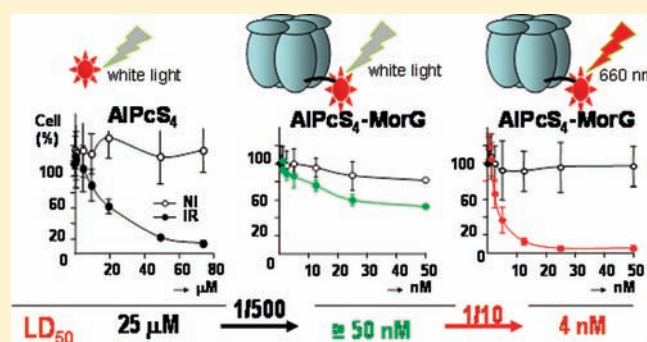
<sup>‡</sup>UMR-CNRS 5546, 31326 Castanet-Tolosan, France

<sup>§</sup>INSERM U858, 31432 Toulouse, France

<sup>#</sup>Department of Molecular Biotechnology, Ghent University, Belgium

**S** Supporting Information

**ABSTRACT:** Morniga G is a plant lectin selective for high density of tumor-associated carbohydrate T and Tn antigens on the surface of cells. The interaction of the protein with Tn induces its cell penetration. This property was used for targeting photosensitizers (consisting of the porphyrins TrMPyP and TPPS, the Al(III)-phthalocyanin AIPcS<sub>4</sub>, and the chlorin e6) against leukemic Jurkat T cells after covalent coupling to the protein. The control of MornigaG/photosensitizer loading allowed the comparison of the toxicity of the different photosensitizer conjugates. Conjugate including a single AIPcS<sub>4</sub> per protein appeared promising, since it is poorly toxic when irradiated under white light, while it shows a strong phototoxicity (LD<sub>50</sub> = 4 nM) when irradiated in the therapeutic window, it preferentially kills cancerous lymphocytes, and the sugar binding specificity of the lectin part of the molecule remains unaltered.



### INTRODUCTION

Medicinal, i.e., photodynamic therapy (PDT), or biological uses of photosensitizers (PS) often suffer from a lack of cell selectivity.<sup>1–7</sup> The employment of carriers to enhance drug selectivity is one strategy to increase their efficiency and to reduce their side effects in antitumor therapy. Taking advantage of highly specific lectin/sugar epitope interaction to direct the PS in the desired tumor cell can be a solution to the selectivity problem.<sup>8–12</sup> Recently, we prepared a covalent conjugate between Morniga G (MorG), a plant lectin selective for clustered T and Tn antigens on the surface of cells, and a cationic porphyrin: TrMPyP.<sup>13</sup> Morniga G was isolated from the bark of black mulberry (*Morus nigra*) and belongs to the family of jacalin-related lectins. The native lectin is a homotetramer with a molecular mass of 72 kDa and 4 sites of sugar recognition.<sup>14–16</sup> Each monomer contains a short  $\beta$  (2.175 kDa) and a long (16 kDa)  $\alpha$ -chain, both involved in the saccharide binding. Although Morniga G is specific for galactose pyranoside moiety at a monosaccharide level, it reacts better with glycoproteins presenting a high density of tumor-associated carbohydrate antigens Tn (GalNAc $\alpha$ 1-Ser/Thr) and T $\alpha$  (Gal $\beta$ 1–3GalNAc $\alpha$ 1-Ser/Thr).<sup>14,17,18</sup>

Preliminary experiments demonstrated that the TrMPyP-MorG conjugate was quickly and specifically internalized by leukemic Jurkat T cells (known to be Tn-positive cells) and exhibited a dramatically increased phototoxicity as compared to

free (unconjugated) TrMPyP.<sup>13</sup> This phototoxicity was correlated to cell penetration and can be inhibited by suppressing the Tn/MornigaG interaction (by complementary carbohydrates). In addition, TrMPyP-MorG caused a selective leukemic cell death when compared to healthy T lymphocytes. These results are promising for the possible development of such conjugates for PDT and particularly for extracorporeal photochemotherapy that is developed to treat blood malignant leukocytes.<sup>19,20</sup>

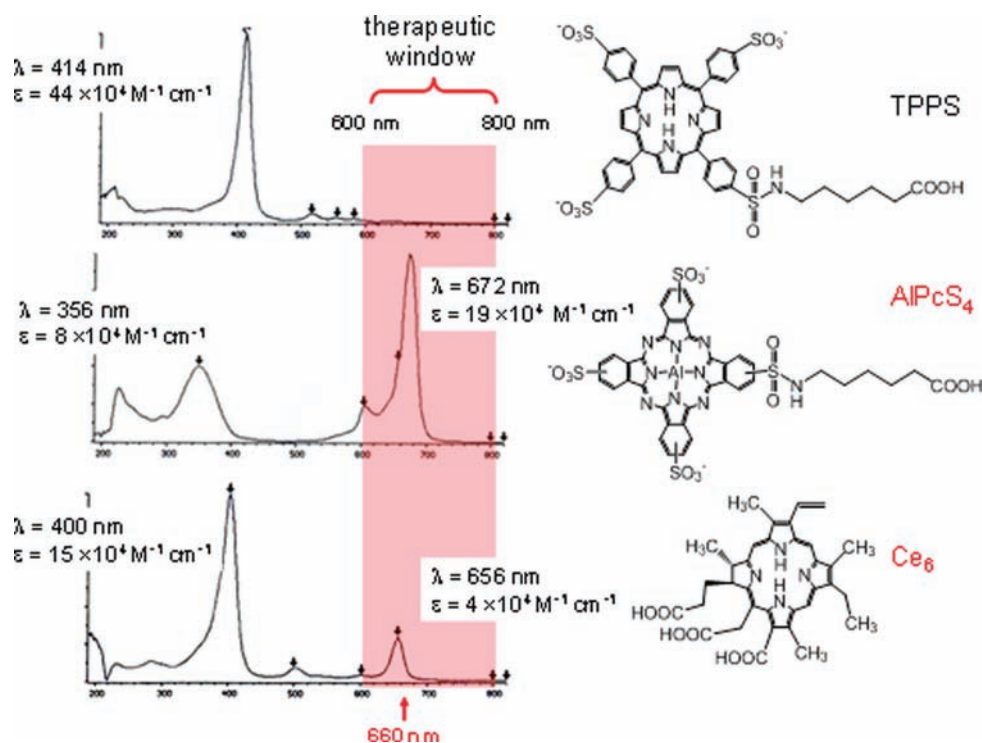
These primary results validate the targeting strategy. However, TrMPyP is probably not the best adapted PS, since this dissymmetric porphyrin is difficult to synthesize,<sup>21</sup> and it is only efficiently activated by irradiation wavelength corresponding to its Soret band ( $\sim$ 420 nm) far away from the therapeutic window (600–800 nm) where biomolecules do not absorb.<sup>1,2,5,6</sup> In the present work, we intend to optimize this first generation of PS-MorG conjugates by modulating the photosensitizer part.

In the past, Al(III)-tetrasulfonatophthalocyanine (AIPcS<sub>4</sub>)<sup>4,6</sup> and chlorin e<sub>6</sub> (ce<sub>6</sub>)<sup>2,4,6</sup> derivatives have been used and even clinically tested in PDT. These compounds, that are commercially available or easy to prepare, have received particular attention due to the high molar absorption coefficient of their

**Received:** December 14, 2010

**Revised:** June 14, 2011

**Published:** June 14, 2011



**Figure 1.** Spectrophotometric spectra of the used photosensitizers. TPPS **1** and AlPcS<sub>4</sub> **2** derivatives are shown; axial ligand on aluminum was omitted. Significant absorbances are given.

Q bands in the clinically useful part of the visible spectrum (Figure 1). Therefore, these molecules were chosen here to prepare new conjugates to Morniga G. Conjugates with *meso*-tetra(4-sulfonatophenyl)porphyrin (TPPS) including four sulfonate groups as in AlPcS<sub>4</sub> were also prepared to compare the phthalocyanine conjugates with a porphyrin series. Care was taken to obtain the same number of PS per protein for a clear comparison of the conjugate efficiency regarding their phototoxicity on Jurkat cells. A clear effect of the excitation wavelength was observed. Since our previous results showed that the cell penetration is due to the Morniga G part of the conjugates, this study reports on a clear comparison of cell phototoxicity of classical PS under very similar penetration conditions.

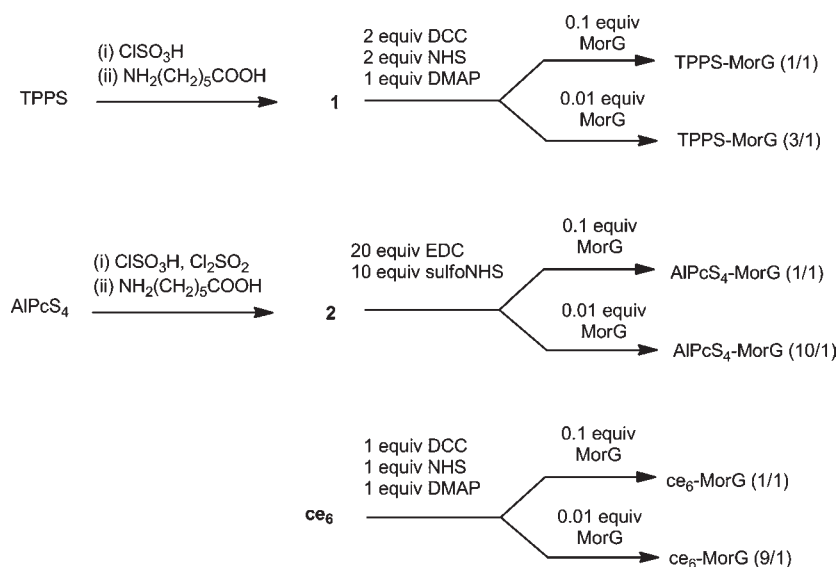
## EXPERIMENTAL PROCEDURES

**General Procedures.** Tetrasodium-*meso*-tetra(4-sulfonatophenyl)porphyrin dodecahydrate, chlorin e<sub>6</sub>, and Al(III)-tetrasulfonatophthalocyanine chloride were purchased from Frontier Scientific Inc. Other commercially available reagents and solvents were purchased from standard chemical suppliers and used without further purification. Sep-Pak C18 cartridge (20 cc, 5 g, Waters) and Slide-A-Lyzer dialysis cassettes (10 000 MWCO, 0.5–3 mL, Pierce) were used for purification. Stirring was performed with a Thermomixer Comfort (Eppendorf) at 1200 and 500 rpm for carboxylic acid activation and coupling reaction, respectively. MALDI-TOF analyses were performed on a Voyager-DE PRO spectrometer (Applied Biosystems), a solution of sinapic acid in acetonitrile and TFA (30%/0.1%) was used as matrix. The protein concentration was determined by MicroBCA assay (Pierce); the quantification was done from bovine serum albumin standard curve.

*5-[4-(7-Carboxy-1-pentasulfonimide)-phenyl]-10,15,20-tris-(4-sulfonatophenyl)porphyrin (1).* A solution of TPPS (20 mg, 0.02 mmol) in 300  $\mu$ L of chlorosulfonic acid was stirred for 2 h at 50 °C then carefully poured over ice to obtain a precipitate that was filtered and dried over P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. This product was added in small portions to an aqueous solution (1 mL) of 6-aminohexanoic acid (11.5 mg, 0.09 mmol) and sodium carbonate (37 mg, 0.35 mmol), and the mixture was stirred for 5 h at room temperature. Then, pH was adjusted to 6–7 with aqueous HCl and the reaction mixture was purified over a C18 cartridge with 0–33% CH<sub>3</sub>OH in sodium phosphate buffer (10 mM pH 5.0). The collected product was desalted on C18 cartridge (H<sub>2</sub>O washing followed by elution with a H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>OH (3/1) mixture) to give **1** (5 mg, 20%) as a red powder. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  8.89–8.87 (m, 6H), 8.82 (d, 2H, *J* = 5.0 Hz), 8.46 (d, 2H, *J* = 8.2 Hz), 8.23 (d, 2H, *J* = 8.2 Hz), 8.19 (d, 6H, *J* = 8.2 Hz), 8.05 (d, 6H, *J* = 8.2 Hz), 7.94 (t, 1H, *J* = 6.0 Hz, NH), 3.08 (m, 2H), 2.26 (m, 2H), 1.61–1.51 (m, 4H), 1.42 (m, 2H), –2.92 (s, 2H, NH-pyrrole). <sup>13</sup>C NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  174.9, 148.3, 145.5, 141.6, 140.9, 135.3, 134.2, 132.1, 125.6, 124.7, 120.6, 120.9, 118.6, 43.2, 34.1, 29.4, 26.2, 24.7. ESI (<0) MS: *m/z* = 348.2 [M]<sup>3-</sup>, 533.7 [MNa]<sup>2-</sup>. HRMS (ESI > 0) obs 1048.1693 [MH]<sup>+</sup>, calcd for C<sub>50</sub>H<sub>42</sub>N<sub>5</sub>O<sub>13</sub>S<sub>4</sub>: 1048.1662.

*Carboxy-1-pentasulfonimide of Aluminum-tetrasulfophtalocyanine (2).* It was prepared as previously described,<sup>22</sup> with minor modifications concerning its purification step that was conducted on C18 cartridge as for compound **1**. Due to the presence of isomers, monosubstituted compounds were eluted as different fractions. They were selected by ES-MS analysis before being pooled.

*TPPS-MorG Conjugates.* To a solution of **1** (23 mM in dry DMSO, 1 equiv) were added 1 equiv of 4-dimethylaminopyridine (DMAP, dissolved at 50 mg/mL in DMSO), 2 equiv of



**Figure 2.** Synthesis of the PS-MorG conjugates.

dicyclohexylcarbodiimide (DCC, 100 mg/mL in DMSO), and 2 equiv of *N*-hydroxysuccinimide (NHS, 100 mg/mL in DMSO) and the mixture was stirred for 2 h at 50 °C in the dark. Activated ester was precipitated by adding 9 volumes of CHCl<sub>3</sub>. Supernatant was removed after centrifugation (15 min, 15 °C, 9000 rpm) and the pellet was washed with CHCl<sub>3</sub>, then dried under vacuum. The product was dissolved in dry DMSO (20 mM). Then, 2  $\mu$ L (~10 equiv with respect to Morniga G) or 19  $\mu$ L (~100 equiv) of this mixture was added to 300  $\mu$ L of a solution of Morniga G (14  $\mu$ M, 1 mg/mL) in sodium borate buffer 50 mM pH 8.8 where D-galactose (3 mg, 17  $\mu$ mol) was added just before use. After stirring for 90 min at 37 °C in the dark, additional D-galactose (3 mg, 17  $\mu$ mol) was added and the mixture was stirred for 15 h before purification (see the general method below).

**AlPcS<sub>4</sub>-MorG Conjugates.** 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide-hydrochloride (4.6 mg, 24  $\mu$ mol) and *N*-hydroxysulfosuccinimide sodium salt (1.6 mg, 12  $\mu$ mol) were added to a solution of **2** (1.30 mg, 1.21  $\mu$ mol) in 200  $\mu$ L of sodium phosphate buffer (10 mM, pH 5.0). The mixture was stirred for 90 min at room temperature, purified over a Sep-Pak C18 1 cm<sup>3</sup> cartridge (Waters) by 20 mL phosphate buffer washing, followed by elution with 1 mL of phosphate buffer/CH<sub>3</sub>OH (1/3, vol/vol). Aliquots corresponding to 10 or 100 equiv with respect to Morniga G were lyophilized. Then, these aliquots received 300  $\mu$ L of a Morniga G solution (14  $\mu$ M, 1 mg/mL) in sodium borate buffer 50 mM pH 8.8 where D-galactose (3 mg, 17  $\mu$ mol) was added just before use. After stirring for 90 min at 37 °C in the dark, additional D-galactose (3 mg, 17  $\mu$ mol) was added and the mixture was stirred for 15 h before purification (see the general method below).

**Chlorin e<sub>6</sub>-MorG Conjugates.** To a solution of ce<sub>6</sub> (1.36 mg, 2.3  $\mu$ mol, 26 mM, 1 equiv) in dry DMSO were added 1 equiv of DMAP (dissolved at 50 mg/mL in DMSO), 1 equiv of DCC (100 mg/mL in DMSO), and 1 equiv of NHS (100 mg/mL in DMSO), and the mixture was stirred for 2 h at 50 °C in the dark. Then, 2  $\mu$ L (~10 equiv with respect to Morniga G) or 19  $\mu$ L (~100 equiv) of this mixture was added to 300  $\mu$ L of a solution of Morniga G (14  $\mu$ M, 1 mg/mL) in sodium borate buffer 50 mM pH 8.8 where D-galactose (3 mg, 17  $\mu$ mol) was added just before use. After stirring for 90 min at 37 °C in the dark, additional

D-galactose (3 mg, 17  $\mu$ mol) was added and the mixture was stirred for 15 h before purification (see the general method below).

**General Method of Purification and Quantification of MornigaG-Photosensitizer Conjugates.** Conjugates were dialyzed (at 4 °C in the dark) against PBS buffer containing 50 mM D-galactose (2 times) then PBS (4 times). The mixture was then purified on NickSpin G25 column eluted with PBS. Conjugates were then quantified on aliquots by microBCA assay (for Morniga G) and UV-visible spectrophotometry (for the photosensitizer part) using published molar extinction coefficients of TPPS,<sup>23,24</sup> AlPcS<sub>4</sub>,<sup>22</sup> and ce<sub>6</sub>,<sup>25–27</sup> respectively (see Supporting Information Figure S3). The conjugate solutions in PBS were stored at 4 °C.

**Photodynamic Treatment and Cell Death Evaluation.** Parental Jurkat T leukemia cells (clone A3) were grown or maintained in RPMI 1640 medium containing glutamate, 10% FCS, and 1% penicillin/streptomycin. Cells (10<sup>6</sup> cells/mL) were exposed to photosensitizers for 15 min at 37 °C, then they were pelleted and washed in RPMI 1640 medium before being taken in RPMI 1640 medium with 10% FCS and 1% penicillin/streptomycin in 96-well plates (10<sup>5</sup> cells/well). Then, they were irradiated with a bank of four white fluorescent tubes (Philips master TL-D 18W/840) for 7.5 min (allowing a 1.7 J/cm<sup>2</sup> light dose) or with a bank of 96 red ( $\lambda$  = 660  $\pm$  20 nm) LEDs (one per well) for 2 min at 140 W/m<sup>2</sup> (1.7 J/cm<sup>2</sup> light dose). Then, cells were incubated for 24 h at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, before cell viability determination by the MTT reduction method.<sup>28</sup> All experiments were carried out in triplicate independent experiments.

Healthy blood samples were obtained from the hematology department (Rangueil Hospital, Toulouse). Normal T lymphocytes were separated from blood using the Rosette Sep human T cell enrichment cocktail (StemCell Technologies, Grenoble, France).<sup>29</sup> A mixture of freshly isolated healthy T lymphocytes and Jurkat T cells was treated by photochemotherapy. The percentage of each viable cell type was determined after PDT by flow cytometry, using the cell size and CD1d mAb staining (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA). T lymphocytes were defined as CD1d-negative cells with low size and Jurkat T cells as CD1d-positive cells with a greater size. The cell size allowed an efficient discrimination between leukemic and normal T cells.



**Statistical Analysis.** Results are expressed as the means  $\pm$  SD of data obtained from at least 3 independent experiments. Statistical significance, determined by means of Student's *t*-test, was considered when  $P < 0.05$ .

**Hemagglutination Assays.** They were carried out in 96-well plates in 0.9% NaCl as previously described.<sup>30,31</sup> Briefly, hemagglutination titers were determined using serial dilutions of Morniga G or PS-MorG (50  $\mu$ L) mixed with equal volumes of a 1% rabbit erythrocytes suspension (bioMérieux) during 45 min at room temperature. This was scored as the minimum hemagglutination concentration (MHC) of the lectin. Inhibition of hemagglutination was performed using serial dilution of glucose, mannose, galactose or *N*-acetyl- $\alpha$ -D-galactosamine in Morniga G or PS-MorG solutions mixed with equal volumes of a 1% rabbit erythrocytes suspension. This was scored as the minimum inhibition concentration of sugar solution. All experiments were carried out in triplicate.

## RESULTS AND DISCUSSION

**Synthesis of PS-MorG Conjugates.** Syntheses are depicted in Figure 2. The water solubility of PS allowed coupling with Morniga G in an aqueous medium which minimized protein denaturation.

For TPPS and AlPcS<sub>4</sub>, a spacer arm including a carboxylic group was first added giving compounds **1** and **2**, respectively. Then, the carboxylic group was activated for the covalent attachment to Morniga G by amide linkage. Two major precautions were taken for this step (see Experimental Procedures): (i) activated esters were purified before their addition to the protein because we observed that excess of activating agents induced undesired cross-linkage between MornigaG  $\alpha$ -chains (it appeared as a new band with an apparent molecular weight of  $\sim$ 50 kDa on SDS-PAGE control analysis of the coupling reaction; results not shown); (ii) docking experiments showed that a potential site of conjugation (NH<sub>2</sub>-end of the protein) is located within the carbohydrate-binding site of Morniga G,<sup>14,15</sup> which is a major concern because it has been demonstrated for several lectins including Jacalin that porphyrins interact in the vicinity of this site.<sup>12,32–34</sup> Therefore, this site was protected from conjugation by addition of a large excess of galactose that is one of the most potent monosaccharides interacting with the carbohydrate-binding site of Morniga G.<sup>14–16</sup>

In the case of ce<sub>6</sub>, carboxylic functions of the molecule were used to perform coupling. Unfortunately, we were unable to purify the activated ester. Therefore, activation was performed with only 1 equiv of activators per chlorin molecule. Since ce<sub>6</sub> contains three carboxylic groups, this consumed all the activators and undesired cross-links were not possible even though the coupling step was performed without intermediate purification of the activated ester.

The noncovalent binding of porphyrins and chlorins to proteins is well-documented, and hence, an effective cleanup procedure was optimized.<sup>12,25,26,32,35</sup> The process associated extensive dialysis and Sephadex chromatography to remove all the noncovalently linked PS. No major changes were observed in the PS-MorG absorption spectra measured in phosphate buffer when compared to those obtained for known quantities of free PS in the presence of a MorG (Supporting Information Figure S3). Consequently, simple spectroscopic analysis in association with microBCA dosage allowed quantification of the bound PS per protein.

**Table 1.** LD<sub>50</sub> of the PS-MorG Conjugates on Jurkat Cells

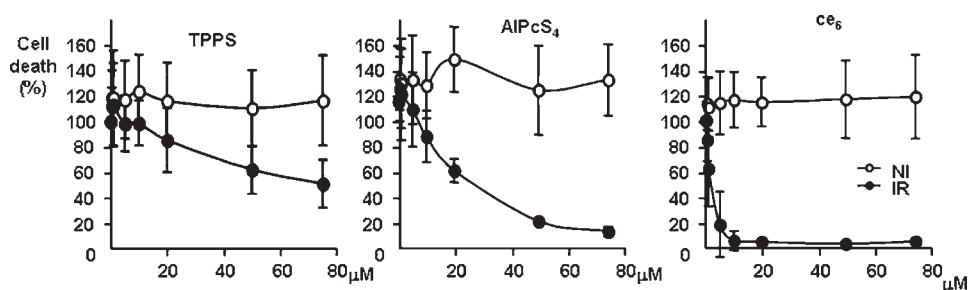
PS	PS/MorG	LD <sub>50</sub> <sup>a</sup> (nM)	
		white light	660 $\pm$ 20 nm
TrMPyP		15 000 <sup>c</sup>	n.d. <sup>b</sup>
TPPS derivative <b>1</b>		>75 000	>75 000
AlPcS <sub>4</sub> derivative <b>2</b>		25 000 $\pm$ 5000	12 000 $\pm$ 6000
ce <sub>6</sub>		2000 $\pm$ 1800	750 $\pm$ 500
TrMPyP-MorG	1/1	<10 <sup>c</sup>	n.d. <sup>b</sup>
TPPS-MorG	1/1	4 $\pm$ 0.3	25 $\pm$ 7
	3/1	2 $\pm$ 0.1 <sup>*</sup>	12 $\pm$ 0.1 <sup>°</sup>
AlPcS <sub>4</sub> -MorG	1/1	$\geq$ 50	4 $\pm$ 1.8
	10/1	35 $\pm$ 3	5 $\pm$ 0.8 <sup>°</sup>
ce <sub>6</sub> -MorG	1/1	16 $\pm$ 4	7 $\pm$ 1.2
	9/1	7 $\pm$ 1.2 <sup>*</sup>	2 $\pm$ 0.8 <sup>*</sup>

<sup>a</sup>LD<sub>50</sub> is the concentration of studied molecule inducing 50% of cell death. <sup>b</sup>n.d. = not determined. <sup>c</sup>Value obtained in ref 13. Values are mean  $\pm$  SD of three independent experiments. For each PS-MorG conjugate, statistical significance was determined between the conjugate with 1/1 PS/MorG ratio and the conjugate with higher PS/MorG ratio. <sup>\*</sup> $P < 0.05$  was considered significant. <sup>°</sup>Unsignificant.

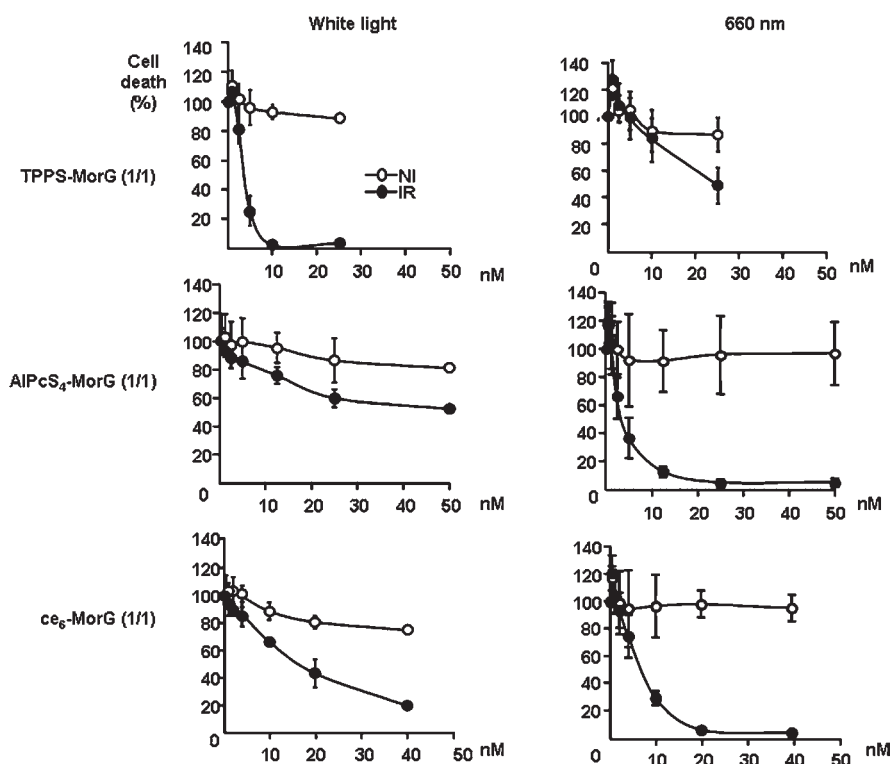
Optimization of the quantity of the activated ester used in the coupling reaction allowed the synthesis of 1/1 PS/MorG conjugates. They were obtained when MorG reacted with 10 equiv of the activated ester form of PS. MALDI-TOF MS revealed that, in the case of these 1/1 conjugates, the major product formed was always a monoadduct on the heavy chain. The light chain proved unmodified (see Figures S1 and S2 of the Supporting Information). This mass analysis showed also that all the noncovalently bound PS was efficiently removed during the purification step (unlinked PS are easy to observe in the *m/z* 500–1200 Da area of the mass spectra, which allowed a control of their elimination, not shown). This result was confirmed by SDS-PAGE analysis where unlinked PSs are also observable (when they are present). Other conjugates including higher PS/MorG ratio (in the 3/1, 10/1, and 9/1 ratio for TPPS-, AlPcS<sub>4</sub>-, and ce<sub>6</sub>-MorG conjugates, respectively) were also prepared by reaction of MorG with 100 equiv of the activated ester form of PS. They consisted of a mixture of 1–3 PS per heavy chain (Supporting Information Figure S2). In the case of ce<sub>6</sub> conjugate, multiadducts also showed some covalent attachment of the PS on the light chain (Supporting Information Figure S1).

**Phototoxicity.** The ability of PS-MorG conjugates to induce cell death after irradiation with white and red light was compared with that triggered by free PS (Table 1). The molecules were tested for cytotoxicity toward Jurkat T cells allowing the comparison with previous study with the TrMPyP/MorG conjugate. The latter compound showed >90% phototoxicity upon white-light irradiation at 10 nM concentration with no toxicity at 1 nM concentration.<sup>13</sup>

Under our experimental conditions, the free lectin was only weakly toxic since a LD<sub>50</sub> of 5  $\mu$ M was observed. This low toxicity of MorG was independent of light irradiation. Whereas no toxicity was noticed after incubation of free PS or conjugates in the absence of irradiation, a dose-dependent cell death was observed for all of them upon irradiation (Figures 3 and 4). However, free PS appeared poorly toxic (LD<sub>50</sub> in the micromolar level) compared to the conjugates (LD<sub>50</sub> in the nanomolar range).



**Figure 3.** In vitro evaluation of PS-mediated cytotoxicity on Jurkat T cells. Cell viability was evaluated using MTT assay. Results are means  $\pm$  SD from 3 independent experiments. NI: non-irradiated; IR irradiation with white light.



**Figure 4.** In vitro evaluation of PS-MorG conjugate-mediated cytotoxicity on Jurkat T cells. Cell viability was evaluated using MTT assay. Results are means  $\pm$  SD from 3 independent experiments. NI: non irradiated; IR irradiation with white light or at 660  $\pm$  20 nm.

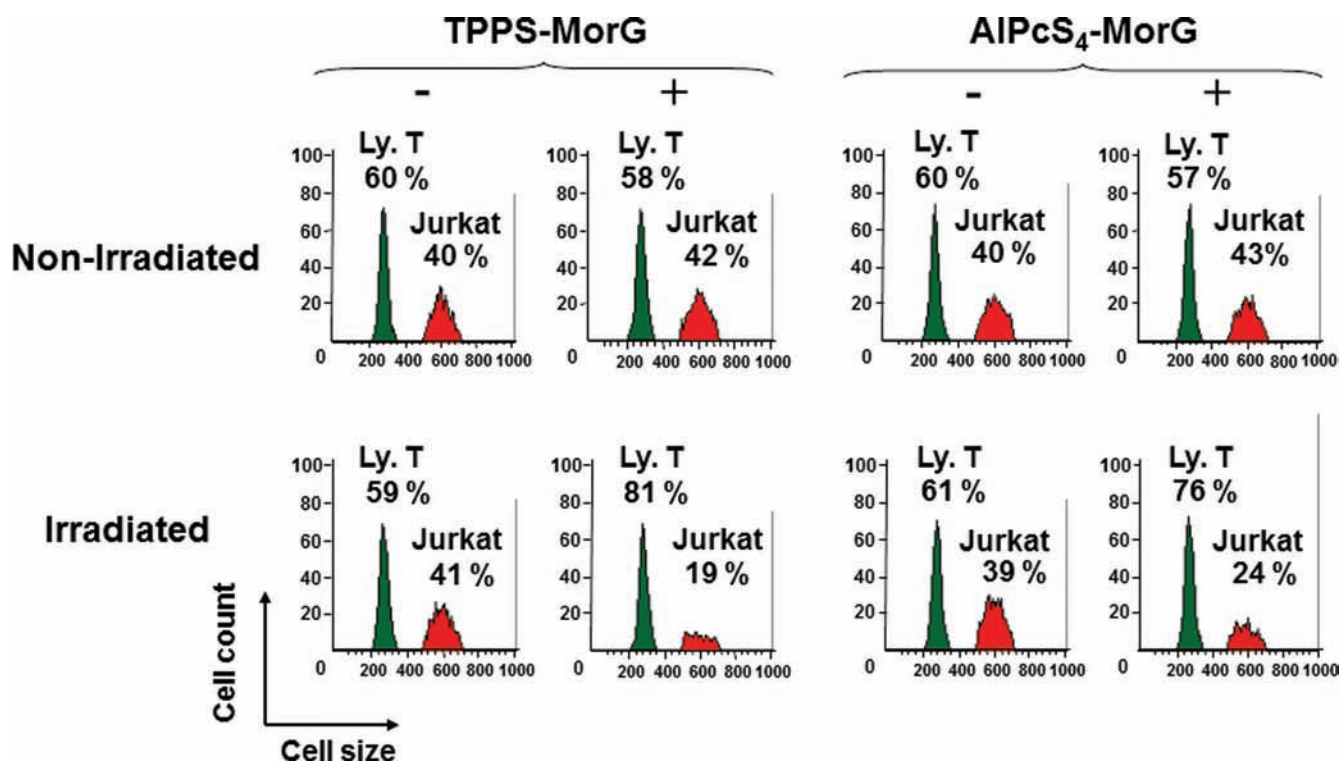
Chlorin e6 appeared more toxic upon irradiation than the other free PS. This activity seems difficult to associate to best photochemical properties of the chlorin since  $ce_6$  shows lower absorbance than TPPS for its Soret band (around 400 nm) and of AIPcS<sub>4</sub> for its Q-band (around 660 nm), respectively (Figure 1). After white light irradiation,  $ce_6$  was more phototoxic than TPPS (Table 1); however, the absorbance of TPPS around 400 nm was 3 times higher, suggesting that TPPS might be the most efficient to induce cell death. This result on cell death can be explained by the complexity of interactions between PS and cells. Indeed, the PS phototoxicity involves photophysical properties of PS molecule, but also (i) its uptake by the cells (depending of PS solubility, molecule electric charges, etc.), (ii) its intracellular concentration, and (iii) its subcellular localization. Thus, recent data demonstrated that two derivatives of pheophorbide with similar photophysical properties and, a priori, potential favorable phototoxicity can demonstrate drastic differences in phototoxicity on cells, because they have strong differences of intracellular

localization.<sup>36</sup> This also probably explains the higher activity of  $ce_6$ , upon red irradiation, when compared to AIPcS<sub>4</sub>.

After the conjugation with MorG, regardless of the PS molecule the conjugation of 1 PS with 1 lectin strongly increased the PS phototoxicity, probably by enhancing the uptake of PS by the cells, as recently demonstrated using the TrMpyP-MorG conjugate.<sup>13</sup> The absorption properties of PS tested here do not change significantly with covalent coupling (Supporting Information Figure S3). However, the cell toxicity of conjugates correlate better with their UV-vis properties when compared to free PS (Table 1).

The nanomolar range of the LD<sub>50</sub> of the 1/1 conjugates shows that the covalent attachment of the PS to MorG greatly increases the phototoxicity. However, major differences due to the nature of the PS linked to the lectin are observed.

For this 1/1 ratio, porphyrin conjugates TPPS-MorG (this work) and TrMpyP-MorG<sup>13</sup> have similar phototoxicity (white light irradiation) from 1 to 10 nM concentrations (Table 1,



**Figure 5.** Phototoxic effect of PS-MorG on a mixture of Jurkat leukemia T cells and healthy T lymphocytes. T lymphocytes ( $10^6$ /mL) from healthy donors were mixed with Jurkat T cells ( $10^6$ /mL), then treated by PS-MorG using the 1/1 PS/MorG conjugates at the  $LD_{50}$  and white light (TPPS-MorG) or red light (AlPcS<sub>4</sub>-MorG), or left untreated, as indicated in the Experimental Procedures section. The cell mixture was analyzed by flow cytometry after 24 h culture. As compared to T lymphocytes, Jurkat T cells were characterized by a larger size. The percentage of the two cell types in the cell mixture was indicated. Results are representative of two independent experiments performed with T lymphocytes from two different donors. Ly. T: T lymphocytes (green); Jurkat: Jurkat T cells (red).

Figure 4, and ref 13), even though TrMPyP is cationic and TPPS is anionic indicating that the charge of the PS has no influence on the phototoxicity. This result is probably due to the lectin part of the conjugate that reaches the same cell area independently of the proper structure of the PS part (if porphyrin part had some influence, the cationic TrMPyP might have shown some difference in reactivity, when compared to TPPS, due to its capacity to interact with anionic biomolecules such as nucleic acids). When irradiation was performed at a more therapeutically useful wavelength of 660 nm, TPPS-MorG conjugate showed a clear decrease in phototoxicity ( $LD_{50}$  25 nM) due to its low absorption at this wavelength (Figure 1).

On the opposite, AlPcS<sub>4</sub>-MorG (1/1) conjugate which is only weakly toxic upon irradiation with white light ( $LD_{50} \geq 50$  nM) shows good activity when red light irradiation was used ( $LD_{50}$  4 nM) (Table 1 and Figure 4). These data are in accordance with the spectroscopic properties of AlPcS<sub>4</sub>, which has a strong absorbance above 660 nm (Figure 1). Therefore, this latter conjugate appears as a promising reagent for development in PDT.

Ce<sub>6</sub>-MorG (1/1) appeared more potent under red light compared to white light. However, the difference between its phototoxicity under white and red light irradiations was lower than that of AlPcS<sub>4</sub>-MorG. These data are also in agreement with the absorbance of ce<sub>6</sub> chromophore (Figure 1) since the Soret band of ce<sub>6</sub> is high in the visible region. Overall, ce<sub>6</sub>-MorG conjugate also seems less interesting since (i) the phototoxicity of the free chlorin e<sub>6</sub> is higher than that of all the other tested PS, increasing the risk of side effects; (ii) the phototoxicity of the conjugate

upon 660 nm irradiation is lower than for AlPcS<sub>4</sub>-MorG; and (iii) the difference of phototoxicity between white and red light irradiation is small ( $LD_{50}$  of 16 and 7 nM, respectively).

Finally, the phototoxicity of TPPS-MorG and AlPcS<sub>4</sub>-MorG conjugate was evaluated comparatively on Jurkat leukemic T lymphocytes and normal T lymphocytes from healthy donors (Figure 5). Irradiation was performed in the most efficient conditions previously observed for each photosensitizer: in white light and at 660 nm for the porphyrin and the phthalocyanin conjugate, respectively. Under the experimental conditions tested, and in accordance with previous results obtained with TrMPyP-MorG,<sup>13</sup> the normal T lymphocytes were clearly more resistant to PS-MorG conjugate-mediated phototoxicity.

Because the efficiency of the PS-MorG conjugates in the destruction of cells will depend on the amount of PS able to be delivered to the target, it seemed desirable to increase the number of bound PS molecules per lectin. Therefore, conjugates of AlPcS<sub>4</sub> and ce<sub>6</sub> including 9 and 10 PS/protein, respectively, were also tested. Their similar PS/protein ratio allowed comparison. However, in both cases, only a minor increase of phototoxicity was observed when compared to 1/1 conjugates (Table 1). A weak but significant increase of  $LD_{50}$  (2 to 3 times) can be observed by increasing the number of PS molecules per lectin with ce<sub>6</sub> but not with AlPcS<sub>4</sub>-MorG conjugate (unsignificant). A similar conclusion can be drawn for a 3/1 TPPS/MorG molecule.

The binding of MorG to antigen clusters is probably due to the presence of several sugar-binding sites on the lectin. Therefore, this surprising result may be explained by a lower capacity of



**Table 2. Hemagglutination Induced by PS-MorG Conjugates**

PS	PS/MorG	MHC <sup>a</sup> (ng/mL)
Morniga G		31
ALPcS <sub>4</sub> -MorG	1/1	27
	10/1	78
ce <sub>6</sub> -MorG	1/1	31
	9/1	156

<sup>a</sup>MHC is the minimum concentration of PS-MorG conjugate that induced agglutination of rabbit erythrocytes.

conjugates with high PS/MorG ratio to interact with clusters of tumor-associated antigens because an excessive PS loading could mask some saccharide-binding sites of the lectin. In an attempt to test this hypothesis, the carbohydrate-binding activity of the conjugates was (semiquantitatively) checked by hemagglutination assays (Table 2). It consists of the determination of the quantity of lectin necessary to agglutinate red blood cells.<sup>30,31,37</sup> To summarize the method, the lectin interacts with carbohydrates on the surface of the erythrocytes, and because the protein has several sugar-binding sites, it can link the red blood cells together, which induces their agglutination. Hemagglutination of red blood cells requires the presence of at least two functional carbohydrate-binding sites per lectin molecule. Therefore, the specific agglutination activity of a lectin or a conjugate is particularly instructive concerning the activity of the whole of binding sites, which is essential to obtain good reactivity against clusters of sugar epitopes on the cell surface.

ALPcS<sub>4</sub>-MorG 1/1 and ce<sub>6</sub>-MorG 1/1 conjugates exhibited the same hemagglutination activity (MHC ~ 30 ng/mL) as the free lectin indicating that the carbohydrate-binding activity of the lectin compound of these conjugates is not altered (Table 2). Hapten inhibition assays further confirmed that the covalent coupling of the PS did not alter the original specificity of the MornigaG toward monosaccharides. Indeed, we determined the minimal concentration of sugar allowing the inhibition of agglutination induced by 125 ng/mL of Morniga G, ALPcS<sub>4</sub>-MorG 1/1, or ce<sub>6</sub>-MorG 1/1 on 1% suspension of rabbit erythrocytes. For the free lectin and both conjugates, the same inhibiting concentrations were obtained: 3.1 and 12.5 mM for galactose and *N*-acetyl- $\alpha$ -D-galactosamine, respectively, when 25 mM of glucose or mannose has no inhibitory effect. This result showed that the original specificity of the Morniga G for *N*-acetyl- $\alpha$ -D-galactosamine and (to a lesser extent) for galactose was conserved for both conjugates.

When ce<sub>6</sub>-MorG 9/1 and ALPcS<sub>4</sub>-MorG 10/1 conjugates were used, a clear decrease of the hemagglutination capacity was observed (Table 2) that was not associated to a decrease of *N*-acetyl- $\alpha$ -D-galactosamine and galactose potential to inhibit hemagglutination (not shown). Taken together, the data observed for the conjugates including 9 or 10 PS per Morniga G could be explained by the blocking of one or two saccharide recognition sites by the PS coupling. Therefore, the observation of a poor increase of phototoxicity when the PS/protein ratio increased can be correlated to a loss of the reactivity of the lectin on sugars that is nevertheless unmodified in the case of the 1/1 ratio.

However, a significant increase of LD<sub>50</sub> (2 to 3 times) can be observed by increasing the number of PS molecules per lectin with TPPS and ce<sub>6</sub> (Table 1). Indeed, in spite of a decrease of MHC, the conjugate conserved a sufficient number of functional carbohydrate-binding sites to trigger hemagglutination. When

conjugates with a high level of PS were used in photodynamic treatment, the probable decrease of binding efficiency toward tumor cells could be compensated, at least partly, by the increase of number of PS molecules linked to the lectin.

## CONCLUSIONS

Morniga G conjugate including one ALPcS<sub>4</sub> per protein appeared to be particularly promising to be developed as a PDT agent, since it is poorly toxic when irradiated by white light, although it shows a notable phototoxicity when irradiated in the therapeutic window, it kills preferentially cancerous lymphocytes and the sugar selectivity of the lectin part of the molecule is unaltered. Furthermore, the control of the MornigaG/PS ratio allowed the comparison of different photosensitizers targeted against tumoral cells expressing Tn antigen. Indeed, the precise 1/1 PS/lectin ratio obtained with conjugates avoided any misleading due to the different penetration levels of various PS.

## ASSOCIATED CONTENT

**S Supporting Information.** MALDI-TOF mass analysis of conjugates and UV-visible spectra of conjugates compared to free lectin and PS. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

## AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

\*E-mail: [marguerite.pitie@lcc-toulouse.fr](mailto:marguerite.pitie@lcc-toulouse.fr).

## ACKNOWLEDGMENT

E. Evangelio and G. Poiroux contributed equally on this work.

## REFERENCES

- (1) Celli, J. P.; Spring, B. Q.; Rizvi, I.; Evans, C. L.; Samkoe, K. S.; Verma, S.; Pogue, B. W.; and Hasan, T. (2010) Imaging and photodynamic therapy: mechanisms, monitoring, and optimization. *Chem. Rev.* 110, 2795–838.
- (2) O'Connor, A. E.; Gallagher, W. M.; and Byrne, A. T. (2009) Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: preclinical and clinical advances in photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* 85, 1053–74.
- (3) Ribeiro, S. M.; Serra, A. C.; and Rocha Gonsalves, A. M. (2008) Immobilised porphyrins in monoterpene photooxidations. *J. Catal.* 256, 331–337.
- (4) Juzeniene, A.; Peng, Q.; and Moan, J. (2007) Milestones in the development of photodynamic therapy and fluorescence diagnosis. *Photochem. Photobiol. Sci.* 6, 1234–45.
- (5) Szacilowski, K.; Macyk, W.; Drzewiecka-Matuszek, A.; Brindell, M.; and Stochel, G. (2005) Bioinorganic photochemistry: frontiers and mechanisms. *Chem. Rev.* 105, 2647–94.
- (6) Nyman, E. S.; and Hynninen, P. H. (2004) Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B* 73, 1–28.
- (7) Soukos, N. S.; Hamblin, M. R.; and Hasan, T. (1997) The effect of charge on cellular uptake and phototoxicity of polylysine chlorin(e6) conjugates. *Photochem. Photobiol.* 65, 723–9.
- (8) Liu, B.; Bian, H. J.; and Bao, J. K. (2010) Plant lectins: potential antineoplastic drugs from bench to clinic. *Cancer Lett.* 287, 1–12.
- (9) Bies, C.; Lehr, C. M.; and Woodley, J. F. (2004) Lectin-mediated drug targeting: history and applications. *Adv. Drug Delivery Rev.* 56, 425–35.

- (10) Gabius, H. J., Siebert, H. C., Andre, S., Jimenez-Barbero, J., and Rudiger, H. (2004) Chemical biology of the sugar code. *ChemBioChem* 5, 740–64.
- (11) Lis, H., and Sharon, N. (1998) Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. *Chem. Rev.* 98, 637–674.
- (12) Komath, S. S., Kavitha, M., and Swamy, M. J. (2006) Beyond carbohydrate binding: new directions in plant lectin research. *Org. Biomol. Chem.* 4, 973–88.
- (13) Poiroux, G., Pitié, M., Culerrier, R., Segui, B., Van Damme, E. J., Peumans, W. J., Bernadou, J., Levade, T., Rouge, P., Barre, A., and Benoist, H. (2011) Morniga g: a plant lectin as an endocytic ligand for photosensitizer molecule targeting toward tumor-associated T/Tn antigens. *Photochem. Photobiol.* 87, 370–7.
- (14) Singh, T., Wu, J. H., Peumans, W. J., Rouge, P., Van Damme, E. J., and Wu, A. M. (2007) Recognition profile of *Morus nigra* agglutinin (Morniga G) expressed by monomeric ligands, simple clusters and mammalian polyvalent glycotopes. *Mol. Immunol.* 44, 451–62.
- (15) Rouge, P., Peumans, W. J., Barre, A., and Van Damme, E. J. (2003) A structural basis for the difference in specificity between the two jacalin-related lectins from mulberry (*Morus nigra*) bark. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 304, 91–7.
- (16) Van Damme, E. J., Hause, B., Hu, J., Barre, A., Rouge, P., Proost, P., and Peumans, W. J. (2002) Two distinct jacalin-related lectins with a different specificity and subcellular location are major vegetative storage proteins in the bark of the black mulberry tree. *Plant Physiol.* 130, 757–69.
- (17) Ohtsubo, K., and Marth, J. D. (2006) Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell* 126, 855–67.
- (18) Springer, G. F. (1997) Immunoreactive T and Tn epitopes in cancer diagnosis, prognosis, and immunotherapy. *J. Mol. Med.* 75, 594–602.
- (19) Maeda, A. (2009) Extracorporeal photochemotherapy. *J. Dermatol. Sci.* 54, 150–156.
- (20) Knobler, R., Barr, M. L., Couriel, D. R., Ferrara, J. L., French, L. E., Jaksch, P., Reinisch, W., Rook, A. H., Schwarz, T., and Greinix, H. (2009) Extracorporeal photopheresis: past, present, and future. *J. Am. Acad. Dermatol.* 61, 652–65.
- (21) Casas, C., Saint-Jalmes, B., Loup, C., Lacey, C., and Meunier, B. (1993) Synthesis of cationic metalloporphyrin precursors related to the design of DNA cleavers. *J. Org. Chem.* 58, 2913–2917.
- (22) Brasseur, N., Langlois, R., La Madeleine, C., Ouellet, R., and van Lier, J. E. (1999) Receptor-mediated targeting of phthalocyanines to macrophages via covalent coupling to native or maleylated bovine serum albumin. *Photochem. Photobiol.* 69, 345–52.
- (23) Tniguchi, V. T. (1978) Ph.D. thesis.
- (24) Khadish, K. M., Smith, K. M., Guillard, R. (2000) in *The Porphyrin Handbook* (Press., A., Ed.) p 198.
- (25) Tarrago-Trani, M. T., Jiang, S., Harich, K. C., and Storrie, B. (2006) Shiga-like toxin subunit B (SLTB)-enhanced delivery of chlorin e6 (Ce6) improves cell killing. *Photochem. Photobiol.* 82, 527–37.
- (26) Hamblin, M. R., Miller, J. L., and Ortel, B. (2000) Scavenger-receptor targeted photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* 72, 533–40.
- (27) Soukos, N. S., Hamblin, M. R., Keel, S., Fabian, R. L., Deutsch, T. F., and Hasan, T. (2001) Epidermal growth factor receptor-targeted immunophotodiagnosis and photoimmunotherapy of oral precancer in vivo. *Cancer Res.* 61, 4490–6.
- (28) Milhas, D., Cuvillier, O., Therville, N., Clave, P., Thomsen, M., Levade, T., Benoist, H., and Segui, B. (2005) Caspase-10 triggers Bid cleavage and caspase cascade activation in FasL-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 280, 19836–42.
- (29) Benoist, H., Culerrier, R., Poiroux, G., Segui, B., Jauneau, A., Van Damme, E. J., Peumans, W. J., Barre, A., and Rouge, P. (2009) Two structurally identical mannose-specific jacalin-related lectins display different effects on human T lymphocyte activation and cell death. *J. Leukoc. Biol.* 86, 103–14.
- (30) Zhang, W., Peumans, W. J., Barre, A., Astoul, C. H., Rovira, P., Rouge, P., Proost, P., Truffa-Bachi, P., Jalali, A. A., and Van Damme, E. J. (2000) Isolation and characterization of a jacalin-related mannose-binding lectin from salt-stressed rice (*Oryza sativa*) plants. *Planta* 210, 970–8.
- (31) Nicolson, G. L., and Blaustein, J. (1972) The interaction of *Ricinus communis* agglutinin with normal and tumor cell surfaces. *Biochim. Biophys. Acta* 266, 543–7.
- (32) Goel, M., Anuradha, P., Kaur, K. J., Maiya, B. G., Swamy, M. J., and Salunke, D. M. (2004) Porphyrin binding to jacalin is facilitated by the inherent plasticity of the carbohydrate-binding site: novel mode of lectin-ligand interaction. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* 60, 281–8.
- (33) Goel, M., Jain, D., Kaur, K. J., Kenoth, R., Maiya, B. G., Swamy, M. J., and Salunke, D. M. (2001) Functional equality in the absence of structural similarity: an added dimension to molecular mimicry. *J. Biol. Chem.* 276, 39277–81.
- (34) Komath, S. S., Bhanu, K., Maiya, B. G., and Swamy, M. J. (2000) Binding of porphyrins by the tumor-specific lectin, jacalin [*Jack fruit* (*Artocarpus integrifolia*) agglutinin]. *Biosci. Rep.* 20, 265–76.
- (35) Sutton, J. M., Clarke, O. J., Fernandez, N., and Boyle, R. W. (2002) Porphyrin, chlorin, and bacteriochlorin isothiocyanates: useful reagents for the synthesis of photoactive bioconjugates. *Bioconjugate Chem.* 13, 249–63.
- (36) Stamati, I., Kuimova, M. K., Lion, M., Yahioglu, G., Phillips, D., and Deonarain, M. P. (2010) Novel photosensitizers derived from pyropheophorbide-a: uptake by cells and photodynamic efficiency in vitro. *Photochem. Photobiol. Sci.* 9, 1033–41.
- (37) Lundquist, J. J., and Toone, E. J. (2002) The cluster glycoside effect. *Chem. Rev.* 102, 555–78.

**Supporting Information for****Comparative Study of the Phototoxicity of Long-Wavelength  
Photosensitizers Targeted by the MornigaG Lectin.**

**Emi Evangelio,<sup>†‡</sup> Guillaume Poiroux,<sup>‡§</sup> Raphaël Culerrier,<sup>§</sup> Geneviève Pratviel,<sup>†</sup> Els J.  
M. Van Damme,<sup>#</sup> Willy J. Peumans,<sup>#</sup> Annick Barre,<sup>‡</sup> Pierre Rougé,<sup>‡</sup> Hervé Benoist,<sup>§</sup>  
Marguerite Pitié<sup>†\*</sup>**

<sup>†</sup> CNRS; LCC (Laboratoire de Chimie de Coordination), 205 route de Narbonne, 31077  
Toulouse, France.

<sup>‡</sup> UMR-CNRS 5546, 31326 Castanet-Tolosan, France

<sup>§</sup> INSERM U858, 31432 Toulouse, France

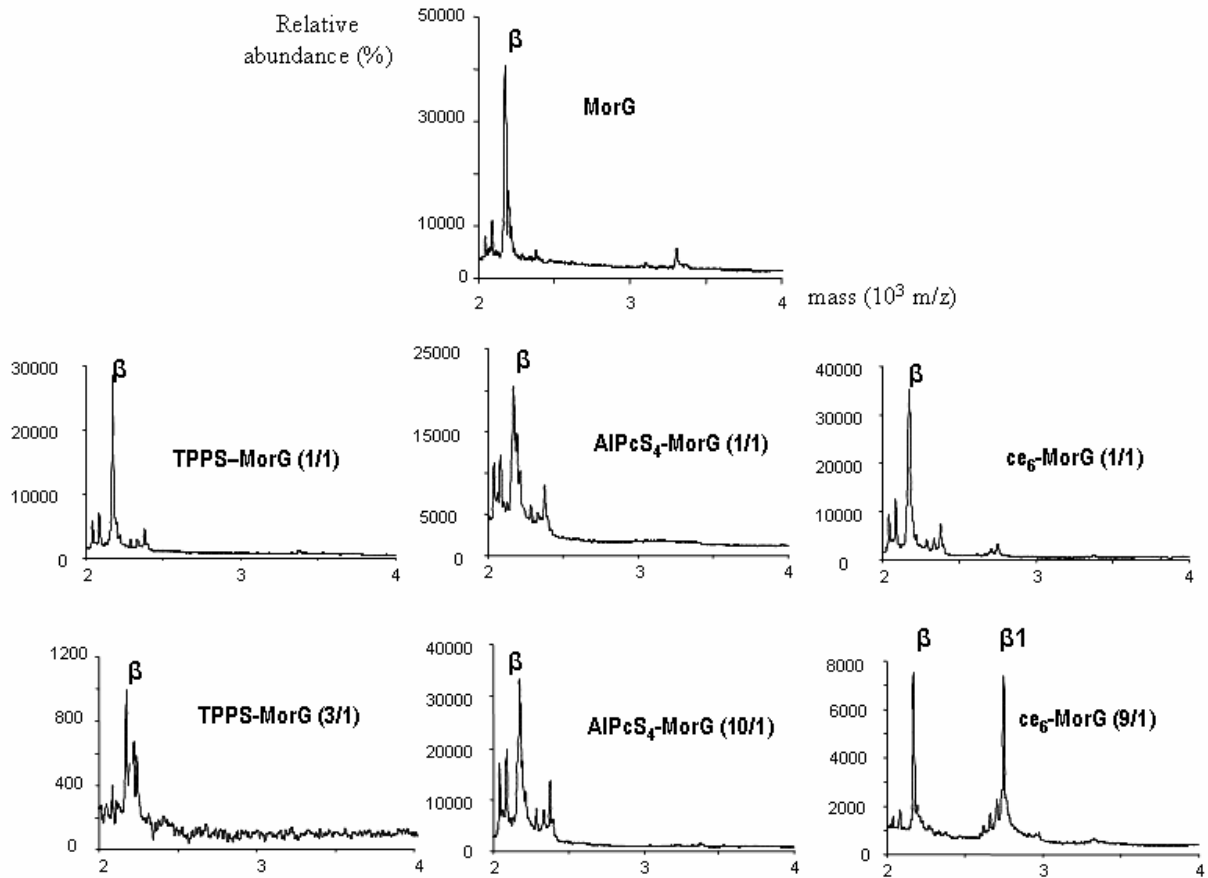
<sup>#</sup> Department of Molecular Biotechnology, Ghent University, Belgium

\* Corresponding author: E-mail: [marguerite.pitie@lcc-toulouse.fr](mailto:marguerite.pitie@lcc-toulouse.fr)

**Figure S1:** MALDI-TOF mass analysis of the  $\beta$  light chain of PS-MorG conjugates.

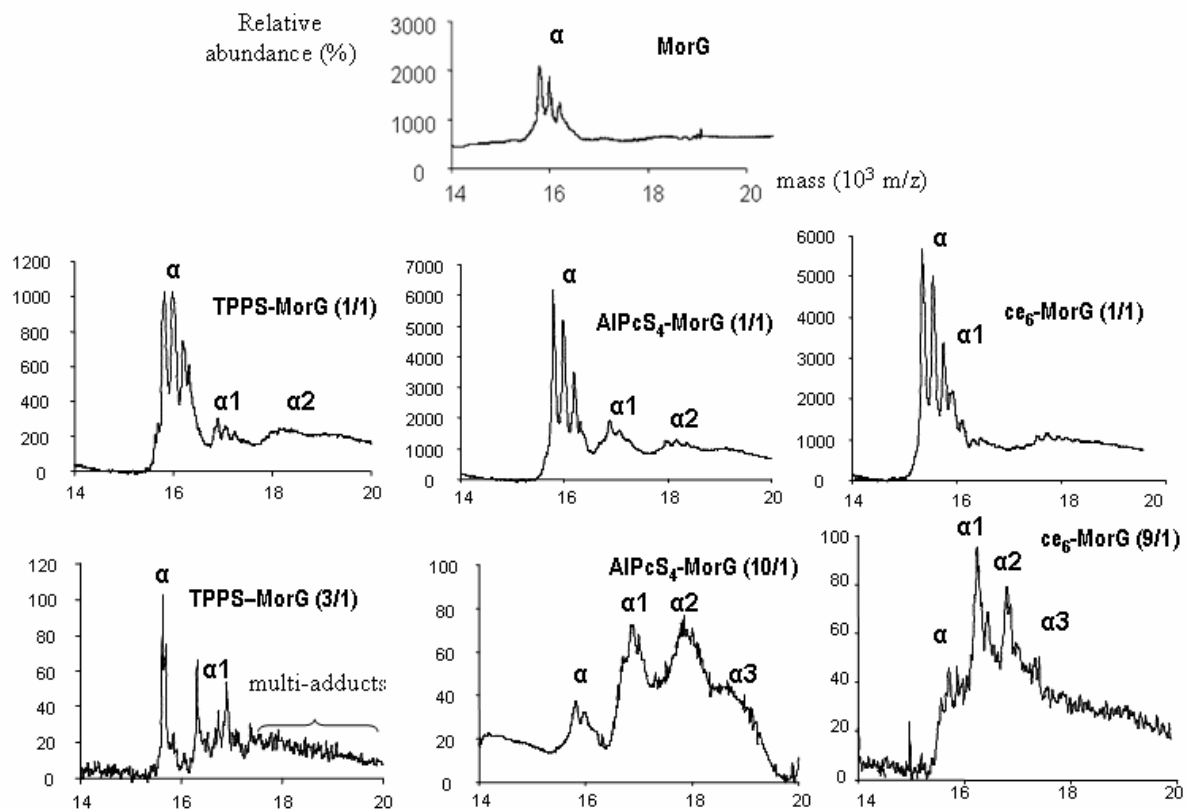
**Figure S2:** MALDI-TOF mass analysis of the  $\alpha$  heavy chain of PS-MorG conjugates.

**Figure S3:** Spectroscopic characterization of PS-MorG conjugates and typical examples of the estimation of the PS/lectine ratio.



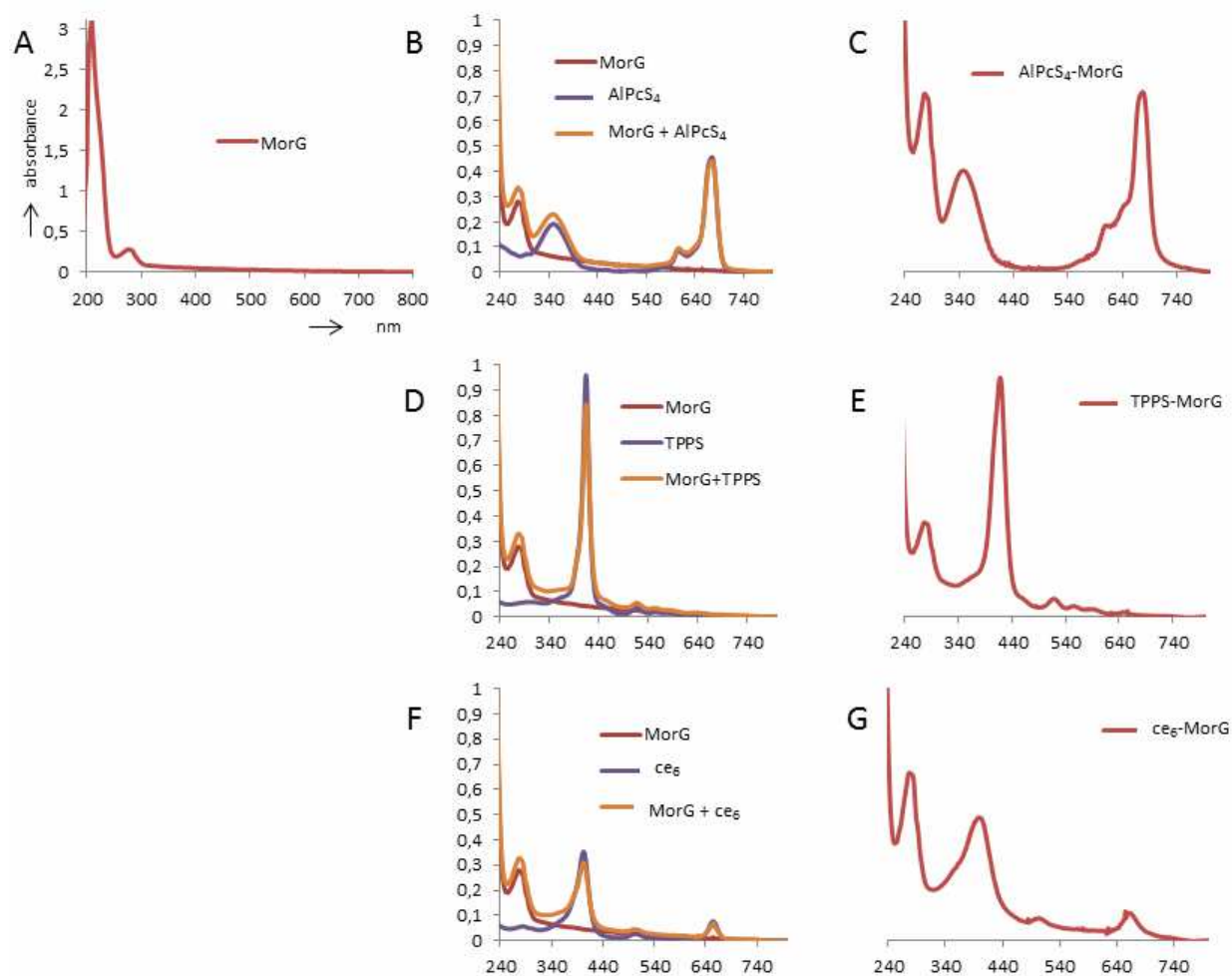
**Figure S1:** MALDI-TOF mass analysis of the  $\beta$  light chain of PS-MorG conjugates.

$\beta$  unmodified subunit (MW = 2,179 Da);  $\beta$ 1:  $\beta$  light chain covalently linked to one PS. The covalent linkage of ce6 on the  $\beta$ -subunit increased the MW of 578 Da.



**Figure S2:** MALDI-TOF mass analysis of the  $\alpha$  heavy chain of PS-MorG conjugates. The  $\alpha$  chain appeared as a mixture of three polypeptides due to glycosylation of this Morniga G subunit.

$\alpha$ : unmodified subunit (MW = 15,800; 15,990 and 16,190 Da);  $\alpha$ 1:  $\alpha$  heavy chain covalently linked to one PS;  $\alpha$ 2:  $\alpha$  heavy chain covalently linked to Two PS;  $\alpha$ 3:  $\alpha$  heavy chain covalently linked to three PS. The covalent linkage of one PS molecule increased the MW of the  $\alpha$ -subunit of 1029, 1079 and 578 Da for TPPS derivative **1**, AlPcS<sub>4</sub> derivative **2** (with a TFA ligand on the Al atom) and ce6, respectively. The  $\alpha$ 1 conjugate appeared in the same mass massif than  $\alpha$  in the case of the covalent linkage of one ce6 du to the weak MW of this ce6 chlorine.



**Figure S3:** Spectroscopic characterization of PS-MorG conjugates and typical examples of the estimation of the PS/lectine ratio. All experiments were performed in PBS buffer.

A: MorG 2.4  $\mu\text{M}$ . This spectrum was reproduced in red on part B, D and F. B: AlPcS<sub>4</sub> derivative **2** at the 2.4  $\mu\text{M}$  concentration (blue) and mixture of MorG 2.4  $\mu\text{M}$  with 2.4  $\mu\text{M}$  of **2** (orange). The presence of MorG induces an increase of 20% of the absorbance at the Soret band of the phthalocyanine when its Q band remained unchanged. C: Typical spectrum of an AlPcS<sub>4</sub>-MorG conjugate. After correction (increase of 20%) due to the presence of MorG on the absorbance of the phthalocyanine, the PS/lectine ratio was calculated to be 0.9 at the Soret band and a similar ratio of 0.85 was observed at the Q band. Therefore, the increase of 20% of the Soret band previously observed for the mixture of free AlPcS<sub>4</sub> and MorG was conserved

for the conjugate since same PS/lectine ratio was measured at the Soret and Q bands when this correction was included. Same argue was used for the estimation of PS/lectine ratios of the others conjugates. D: TPPS derivative **1** at the 2.2  $\mu\text{M}$  concentration (blue) and mixture of MorG 2.4  $\mu\text{M}$  with 2.2  $\mu\text{M}$  of **1** (orange). The presence of MorG induces a decrease of 10% of the absorbance of the Soret band of the porphyrin. E: Typical spectrum of a TPPS-MorG conjugate. After correction due to the presence of MorG on the absorbance of the porphyrin, the PS/lectine ratio was calculated to be 0.9. F: Chlorin e6 at the 2.4  $\mu\text{M}$  concentration (blue) and mixture of MorG 2.4  $\mu\text{M}$  with 2.4  $\mu\text{M}$  of ce6 (orange). The presence of MorG induces a decrease of 20% of the absorbance at the Soret band of the chlorin when its Q band remained unchanged. G: Typical spectrum of a ce6-MorG conjugate. After correction due to the presence of MorG on the absorbance of the chlorin, the PS/lectine ratio was calculated to be 0.7.

For cells experiments, other conjugates showing a PS/lectin ratio of 1 were used.

### III-2-2-3 Discussion de l'article 5 :

La technique de couplage déjà utilisée avec TrMPyP a permis la liaison covalente de différents types de PS à la lectine végétale MorG sans dénaturer la protéine. Toutefois, certains PS (TPPS et AlsPcS4) ont nécessité l'addition d'un bras et d'une fonction carboxylique. Cette technique de couplage NHS permet de réaliser celui-ci en milieu aqueux via l'activation d'un groupement carboxylique, permettant le couplage à des groupements amines libres et accessibles de la lectine. La présence de PS couplés de façon covalente est mise en évidence par spectrométrie de masse MALDI-TOF.

Lorsque la phototoxicité des deux types de porphyrine libre est comparée, ces deux PS présentent des DL50 différentes de 15  $\mu\text{M}$  pour TrMPyP et de 80  $\mu\text{M}$  pour TPPS, après irradiation des cellules Jurkat en lumière blanche, ce qui peut s'expliquer par leur caractère respectivement cationique ou anionique. De plus, les deux porphyrines présentent d'autres caractéristiques physicochimiques différentes. Alors que TrMPyP est une porphyrine cationique de coefficient d'extinction molaire  $\epsilon_{434} = 20.10^4 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$  (à 434 nm), TPPS est une porphyrine anionique de coefficient d'extinction molaire  $\epsilon_{414} = 44.10^4 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$  (à 414 nm). Ainsi, à leur pic d'absorbance maximale respectif, TPPS a la capacité d'absorber deux fois plus de lumière que TrMPyP. Or lorsque leur activité phototoxique est comparée sur les cellules Jurkat, TrMPyP est 5 fois plus actif que TPPS. Comme évoqué précédemment, cette différence peut être en partie attribuée à leur charge électrique, elle-même directement corrélée à leur capacité à être internalisées. En revanche, lorsque ces PS sont couplés de façon covalente à la lectine, leur activité phototoxique est équivalente (DL50 d'environ 5 nM). Ce résultat montre qu'après couplage, la phototoxicité est principalement dépendante de la reconnaissance des cellules par la lectine et de l'endocytose induite par la lectine, et non plus des seules caractéristiques physicochimiques des PS. De plus, l'endocytose par la lectine peut probablement permettre de véhiculer indifféremment TPPS et TrMPyP vers le(s) même(s) compartiment(s) intracellulaire(s), ce que ne permet vraisemblablement pas la différence ionique des deux PS. Comme attendu, l'irradiation de ce type de conjugué par la lumière rouge diminue leur activité phototoxique sur les cellules Jurkat. Vraisemblablement, ce phénomène est attribuable en priorité à la faible absorbance des porphyrines dans ces longueurs d'onde. Cependant, il est possible de les activer dans le rouge, comme par exemple le Photofrin®.

Dans un second temps, des conjugués associant des PS activables par la lumière rouge, c'est-à-dire la Chlorine e6 (Chle6) et la Phtalocyanine aluminium (AlPcS4), à MorG ont été



préparés. Comparativement à la phototoxicité médiée par les PS libres, la conjugaison (1PS/1MorG) permet d'augmenter l'efficacité d'un facteur 100 pour le conjugué Chle6-MorG et d'un facteur 3000 pour le conjugué AlPcS-MorG. L'important gain de phototoxicité du conjugué AlPcS-MorG est certainement dû aux différences d'absorption des deux PS. En effet, le coefficient d'extinction molaire de l'AlPcS4 dans le rouge est plus grand que celui de la Chle6, permettant une activation plus forte de ce type de PS avec la même dose de lumière.

Enfin, comme l'activité phototoxique est dépendante de la quantité de PS présent dans les cellules cibles, des conjugués associant un plus grand nombre de PS ont été préparés et testés sur les cellules Jurkat. Les résultats ne montrent aucun gain de phototoxicité des conjugués avec 10 PS par lectine par rapport aux conjugués avec 1 seul PS par lectine. La capacité de reconnaissance glycanique de ces différents conjugués a été évaluée par des tests d'hémagglutination. Ce test permet de déterminer si les sites de reconnaissance glycanique de la lectine sont conservés ou masqués par le couplage. En effet, l'hémagglutination est maximale lorsque tous les sites de reconnaissance sont libres. La spécificité de reconnaissance glycanique des conjugués peut également être évaluée par des tests d'inhibition de l'hémagglutination par des monosaccharides, afin de déterminer si le couplage modifie la spécificité de reconnaissance glycanique de la lectine. Les résultats montrent que les conjugués avec un ratio 1/1 de PS/lectine présentent la même capacité et la même spécificité de reconnaissance glycanique que la lectine seule. Par contre, le couplage d'une dizaine de molécules de PS sur la lectine affecte l'activité de reconnaissance glycanique sans pour autant modifier la spécificité vis-à-vis de la GalNAc. Ce résultat a été attribué au masquage d'une ou deux cavités de reconnaissance glycanique de la lectine après couplage covalent des PS. De plus, comme il a été montré dans une étude concernant la vectorisation de TrMPyP par un MAb internalisable [328], l'augmentation du ratio PS/MorG entraîne une précipitation des conjugués. Cette précipitation peut être en partie due au stacking des PS.

Pour conclure, MorG semble être un vecteur de PS intéressant. Alors que la pénétration des PS libres est dépendante de leurs caractères physicochimiques (cationique ou anionique), le couplage à MorG permet une endocytose rapide des PS, augmentant considérablement leur phototoxicité tout en conservant la spécificité de reconnaissance glycanique de la lectine. Cette approche permet ainsi d'envisager de cibler différents types de PS vis-à-vis de cellules tumorales exprimant les TACAs T et Tn. Dans l'optique d'une utilisation en PDT (contre des tumeurs solides), le conjugué AlPcS-MorG semble être le plus intéressant et le plus prometteur en raison (1) de sa faible phototoxicité en lumière blanche, et (2) de sa bonne activité phototoxique dans la fenêtre thérapeutique (600-800 nm).

### ***III-2-3: Discussion générale des articles 3, 4 et 5 :***

Toutes les stratégies développées pour traiter le cancer souffrent d'un manque de ciblage des agents anticancéreux vis-à-vis des tumeurs, entraînant des effets secondaires plus ou moins prononcés. La photochimiothérapie est une technique prometteuse puisqu'elle minimise les effets secondaires en comparaison des traitements conventionnels. De plus, contrairement aux techniques conventionnelles qui sont immunosuppressives, il a été montré que la PCT peut induire une réponse immune anticancéreuse [232]. Il a également été rapporté que cette technique permet de traiter des cancers ovariens radio- et/ou chimio-résistants chez la souris [326]. Elle est basée sur l'activité phototoxique de molécules photosensibles (photosensibilisant ou PS), qui ne sont pas toxiques en absence de lumière. Dans l'approche photodynamique (PDT), lorsque ces molécules sont excitées par des photons, elles réagissent avec l'oxygène contenu dans les cellules cibles pour former des espèces réactives de l'oxygène (ROS), qui à leur tour peuvent oxyder les constituants cellulaires et entraîner la mort cellulaire [188]. Ce traitement est sélectif puisque l'irradiation laser peut être confinée au niveau de la tumeur uniquement, par l'utilisation d'un endoscope. Toutefois, les PS utilisés présentent, comme beaucoup de molécules anticancéreuses, des limites de sélectivité et de biodisponibilité vis-à-vis des cellules cancéreuses. Ces molécules ont tendance à interagir avec les cellules saines, notamment les cellules de la peau, et peuvent donc entraîner une hypersensibilité du patient à la lumière du jour. De plus, face à des microtumeurs disséminées au niveau d'un tissu sain ou bien dans des situations anatomiques complexes, la « sélectivité » endoscopique atteint des limites que pourrait faire franchir un ciblage efficace des PS vers les cellules tumorales.

Ainsi, l'utilisation de PS couplés à des molécules vectrices peut être un moyen supplémentaire et très prometteur pour lutter contre le cancer. Différents types de molécules vectrices sont actuellement étudiées. Les anticorps monoclonaux (MAbs) [328,329], les ligands protéiques de type EGF (Epidermal Growth Factor) [299] ou de type CPP (Cell Penetrating Peptides) [330] sont étudiés pour le ciblage de PS vis-à-vis des cellules tumorales. Toutefois, ces molécules ne sont qu'au stade d'étude préclinique et présentent des limites. Par exemple, les MAbs sont des molécules de grande taille (150 à 900 KDa) et de stabilité moyenne. Leur difficulté à pénétrer dans les cellules peut être contournée en utilisant des fragments de MAbs (25 à 50 KDa) [288], qui sont malheureusement encore moins stables que les MAbs de pleine taille. De plus, les résultats expérimentaux concernant ce type de ciblage

montrent souvent une baisse de l'activité phototoxique des conjugués par rapport aux PS libres. Une autre approche consiste à utiliser des peptides qui ciblent généralement des molécules surexprimées par les cellules cancéreuses, mais exprimées par une grande variété de types cellulaires, rendant le ciblage difficile.

Une autre classe de vecteurs potentiels est celle des lectines végétales. Elles sont connues pour être thermodynamiquement très stables et relativement faciles à purifier ou même produites de manière recombinante [331], et sont capables de cibler des cellules et d'être endocytées par l'intermédiaire des glycoconjugués membranaires [323]. Comme pour de nombreuses protéines à activité enzymatique, l'activité glycosyltransférase est perturbée pendant le processus de cancérisation. Ainsi, les cellules cancéreuses peuvent exprimer ou surexprimer à leur surface des TACAs, tels que les antigènes T et Tn, portés par des glycoprotéines. L'expression des antigènes T et Tn est associée à de nombreux cancers épithéliaux [47,48] et leucémies [50]. Certaines lectines sont caractérisées par une grande affinité pour des TACA sous forme clusterisée. C'est pourquoi, nous nous sommes intéressés à la lectine du mûrier noir Morniga G en tant que vecteur potentiel de PS. Cette lectine correspond à un tétramère dont chaque monomère possède un site de reconnaissance glycanique spécifique de l'antigène Tn [177]. En raison de sa tétravalence, cette lectine interagit encore plus fortement avec l'antigène Tn sous forme clusterisée. Ainsi, cette lectine est un candidat potentiel pour le ciblage de cellules tumorales exprimant ou surexprimant l'antigène Tn. Ces protéines pourraient être plus adaptées au ciblage de TACAs que les MAbs. En effet, ces derniers sont difficiles à produire en raison de la faible immunogénicité des glycanes. Ces MAbs sont de type IgG ou IgM, c'est-à-dire des immunoglobulines de masse moléculaire élevée, et les résultats d'évaluation de leur potentiel en imagerie ou en thérapie anticancéreuse sont généralement inconsistentes [332]. De plus, alors que l'affinité des lectines pour les glycanes fait intervenir uniquement la partie glycanique, les MAbs reconnaissent souvent un épitope glycanique associé à un peptide, donc dépendant de la protéine porteuse. Ainsi, les lectines pourraient cibler n'importe quelle protéine présentant l'antigène glycanique d'intérêt, augmentant le nombre de cibles potentielles à la surface des cellules cibles en comparaison des MAbs. A l'inverse, la limite des lectines est la taille du panel de leurs cibles potentielles, rendant le ciblage qu'elles assurent relatif.

Dans un premier temps, nous avons vérifié la spécificité de la lectine MorG dans un contexte cellulaire. Alors que les lymphocytes T sains qui n'expriment pas ou peu d'antigène Tn ne sont pas reconnus par la lectine, dans les mêmes conditions de marquage, les lymphocytes T leucémiques de type Jurkat qui expriment une forte densité d'antigène Tn à

leur surface sont fortement reconnus par MorG. L'interaction de MorG avec les cellules Jurkat peut être réversée par l'utilisation de monosaccharides ou de glycoprotéines présentant des clusters d'antigène Tn. De plus, MorG a la capacité de pénétrer rapidement dans ces cellules. Ce phénomène est dépendant de la reconnaissance des antigènes Tn exprimés à la surface des cellules. L'ensemble de ces résultats préliminaires montrent que MorG représente un candidat sérieux pour la vectorisation de molécules anticancéreuses, puisque (1) MorG interagit spécifiquement avec un TACA (c'est-à-dire l'antigène Tn), et (2) est endocytée rapidement par des cellules exprimant ce TACA.

Dans un second temps, nous avons testé la possibilité de coupler de façon covalente des PS sur MorG. La technique de couplage employée a permis de lier différents PS à la lectine sans pour autant la dénaturer et modifier sa spécificité de reconnaissance pour l'antigène Tn. Les PS sélectionnés pour cette étude (TrMPyP, TPPS, Chle6 et AISPC) présentent des caractéristiques physicochimiques différentes.

Après avoir caractérisé les conjugués, leur activité phototoxique a été testée sur les cellules Jurkat. Tous les conjugués présentent un accroissement (de 100 à 20000 à la DL<sub>50</sub> et avec la longueur d'onde la mieux adaptée au PS donné) de l'activité phototoxique en comparaison des PS libres. Ce résultat est certainement dû à une meilleure pénétration des PS lorsqu'ils sont couplés à la lectine. De plus, lorsque l'on compare les DL<sub>50</sub> de tous les conjugués sur les cellules Jurkat irradiées par des doses lumineuses identiques et en choisissant les conditions d'irradiation optimales blanche pour les porphyrines et rouge pour la chlorine et la phtalocyanine, celles-ci sont toutes de l'ordre de 5 nM de PS, alors que celles des PS libres sont différentes (entre 0,7 µM et 80 µM selon les PS) (*cf. Tab. 1, Article 5*). Ces résultats suggèrent que l'activité toxique des conjugués est fortement conditionnée par la partie lectine qui permet une internalisation efficace de tous les types de PS. Le conjugué AISPC-MorG semble être particulièrement intéressant puisqu'il est activable par des longueurs d'onde comprises dans la fenêtre thérapeutique adaptée au traitement de tumeurs solides.

D'autre part, une étude plus exhaustive du conjugué TrMPyP-MorG a été réalisée. Cette étude a été orientée sur le ciblage de cellules leucémiques puisque ce type de pathologie est souvent associé à des défauts de la *O*-glycosylation, c'est-à-dire l'expression de glycotopes tels que les antigènes T et Tn. Les résultats montrent qu'après photoactivation le conjugué TrMPyP-MorG permet (1) d'éliminer spécifiquement les cellules leucémiques Jurkat mélangées à des lymphocytes T provenant de donneurs sains, et (2) est capable d'induire de la toxicité sur différents phénotypes leucémiques, comme des lignées lymphoïdes

B (SKW6.4 et EBV) ou T (Jurkat, Molt-4 et CEM), des lignées myéloïdes (KG1, KG1a et HL60) et des lymphocytes provenant de patients atteints de leucémie aigue ou chronique. De façon intéressante, l'efficacité de ce conjugué est directement corrélée au niveau de fixation de la lectine à la surface des cellules. Ainsi, ce type de conjugué pourrait être utilisé dans le cadre de la photochimiothérapie extracorporelle (ECP), traitement utilisé à l'heure actuelle dans certains lymphomes et dans la réaction du greffon contre l'hôte, ou dans certaines maladies autoimmunes [190]. Cette technique consiste à réaliser une cytophérèse et à traiter les leucocytes par PCT avant de les réinjecter dans la circulation sanguine du patient. Pour le moment, cette technique utilise des dérivés du psoralène qui après activation par les rayons ultraviolets-A se lient à l'ADN. Par rapport au traitement ECP conventionnel, notre système permettrait d'éviter l'utilisation des UV-A pour traiter les leucocytes malins, rendant la technique moins agressive pour les cellules saines, et permettrait également d'élargir l'utilisation de ce traitement à tous types de pathologies hématologiques associées à des défauts de glycosylation, comme par exemple les leucémies ou les maladies autoimmunes. En effet, l'activation lymphocytaire est accompagnée de changements caractéristiques de la glycosylation. Certains de nos résultats montrent que la lectine peut interagir plus fortement avec des lymphocytes activés qu'avec des lymphocytes naïfs. Il serait alors envisageable, en ECP, de cibler et d'induire de la toxicité spécifiquement sur des lymphocytes pathologiquement actifs à l'aide des conjugués PS-MorG. Une étude plus approfondie chez le petit animal est nécessaire pour confirmer le potentiel thérapeutique de ce type de conjugué en ECP.

De plus, selon la dose de PS, la mort cellulaire induite par le conjugué TrMPyP-MorG est apparentée à de l'apoptose ou de la nécrose. La dépendance du type de mort à la dose a déjà été mis en évidence avec différents PS libres, comme par exemple le Calphostin [231], qui à forte dose induit une mort cellulaire caractéristique de la nécrose, et qui à faible dose engage une signalisation apoptotique, après l'irradiation. Ce phénomène est intéressant puisqu'il a été montré que la réinjection des corps apoptotiques peut favoriser la mise en place d'une réponse immunitaire, et que les constituants cellulaires relargués après nécrose peuvent être pro-inflammatoires [208]. Ainsi, il serait intéressant de déterminer les conditions pour lesquelles la réponse immunitaire est optimale. Par ailleurs, l'apoptose médiée après la photoactivation du conjugué TrMPyP-MorG dans les cellules Jurkat semble être majoritairement indépendante des caspases. Ce type de cytotoxicité peut être un atout supplémentaire puisque les cellules tumorales sont souvent associées à une résistance à la mort cellulaire dépendante des caspases.

Enfin, des expériences préliminaires de ciblage de tumeur chez le petit animal ont été réalisées avec MorG couplée à des fluorochromes. Les tumeurs de cellules Jurkat ont été implantées en sous-cutanées. La lectine a été injectée par voie systémique et suivie en mode séquentiel par imagerie sur l'animal vivant. Les résultats montrent que la lectine semble être capable de cibler les cellules Jurkat *in vivo*. Les résultats les plus démonstratifs ont été obtenus avec des tumeurs liquides de cellules Jurkat. Pour cela, les cellules sont injectées en sous-cutanées puis la lectine est injectée par voie systémique. Une zone fluorescente correspondant aux cellules Jurkat apparaît quelques minutes après l'injection de la lectine. Après 5 heures, le ratio de fluorescence peau/tumeur diminue, suggérant que la lectine reste concentrée au niveau de la tumeur et que le reste de la lectine est éliminée. De plus, le fait que la lectine a souvent été retrouvée dans le foie et les reins quelques heures après l'injection indique qu'elle est éliminée rapidement de l'organisme.

## **IV DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES :**





Toutes les cellules vivantes sont composées de trois constituants principaux : les protéines, les lipides et les glycanes. Les glycanes peuvent être libres ou associés aux protéines ou aux lipides : ce sont les glycoconjugués. La biosynthèse des glycoconjugués protéiques emprunte deux voies majeures selon le type de liaison que fait le glycanes avec la séquence polypeptidique : la *O*-glycosylation et la *N*-glycosylation. Ces deux types de glycosylation sont respectivement représentés par le galactose et le mannose. La fonction primaire des glycanes est d'assurer le maintien des structures protéiques (structure secondaire, tertiaire et quaternaire). Les glycanes permettent également de réguler la force des interactions mises en jeu dans les complexes protéiques. Ainsi, ils participent aux phénomènes de signalisation intracellulaire, de communication intercellulaire et d'adhésion cellulaire [4]. Leur qualité est régulée en fonction de l'état physiologique des cellules, c'est-à-dire, par exemple, pendant les phénomènes de différenciation, d'activation ou de cancérisation. Ainsi, les cellules tumorales expriment des antigènes glycaniques associés aux tumeurs (ou TACA), tels que les antigènes T (CD176 ; Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ 1-*O*-Ser) et Tn (CD175 ; GalNAc $\alpha$ 1-*O*-Ser) [40]. Ces glycotopes peuvent être exprimés par des tumeurs liquides, comme par exemple les leucémies [50], ou solides, comme par exemple les cancers épithéliaux [47,48].

Bien que les glycanes participent aux interactions protéine/protéine, la plupart de ces interactions sont dépendantes des séquences peptidiques. Une classe de composés qui a la capacité d'interagir exclusivement avec des glycanes est celle des lectines. Celles-ci sont retrouvées dans tout le vivant (règnes animal et végétal). Certaines lectines végétales ont des effets biologiques intéressants sur les cellules humaines, et sont connues pour leurs propriétés immunomodulatrices et/ou anticancéreuses. L'exemple le plus connu est celui de la ConA qui, à des doses non toxiques pour l'organisme, peut stimuler les défenses immunes anticancéreuses [122,136] ou avoir un effet cytotoxique sur des cellules tumorales [138]. De plus, d'autres lectines interagissent spécifiquement avec des antigènes glycaniques associés aux tumeurs. Celles-ci pourraient être utiles pour améliorer le ciblage des agents anticancéreux [178,179,180].

Ainsi, nous nous sommes proposés d'évaluer le potentiel de la lectine végétale Morniga G (MorG), extraite de l'écorce de mûrier noir, dans le cadre du traitement anticancéreux. Des études préalables ont montré sa capacité à interagir spécifiquement avec les résidus galactose et N-acétylgalactosamine, et plus particulièrement avec les antigènes glycaniques associés aux tumeurs T et Tn [177]. Cette lectine possède une protéine homologue, également extraite de l'écorce de mûrier noir : Morniga M (MorM). Cette lectine

interagit spécifiquement avec les résidus mannose [333]. Ces deux lectines possèdent une structure tridimensionnelle très proche mais des spécificités de reconnaissance glycanique différentes. MorG interagirait plutôt avec la *O*-glycosylation [177] et MorM avec la *N*-glycosylation [318].

Nous avons (1) étudié et comparé les effets biologiques de ces deux lectines, et (2) évalué le potentiel de MorG dans le cadre du ciblage de molécules anticancéreuses.

La connaissance des effets immunomodulateurs et toxiques de MorG est fondamentale pour penser l'utiliser chez l'homme en thérapie anticancéreuse. Nous avons montré, qu'à faibles doses (10 µg/ml pour MorG et 5 µg/ml pour MorM), les deux lectines du mûrier noir sont capables d'activer les populations lymphocytaires T et NK du sang périphérique. MorG est également capable d'activer les lymphocytes B. Ces deux lectines pourraient interagir avec les CD7, CD34 et CD45, qui sont des récepteurs participant à l'activation des lymphocytes et qui sont densément glycosylés. Cependant, certaines glycoprotéines sont spécifiquement *N*- ou *O*-glycosylées, faisant d'elles des cibles privilégiées de l'une ou l'autre lectine du mûrier noir. Par exemple, le TcR et le CD28 sont des molécules d'activation uniquement *N*-glycosylées, et le CD8 est principalement *O*-glycosylé. De plus, à des doses supérieures (20 µg/ml), elles sont toxiques uniquement pour les lymphocytes activés et les lymphocytes leucémiques de type Jurkat, indiquant des changements de glycosylation entre lymphocytes au repos, activés et leucémiques. MorM est capable d'induire une toxicité sur des lymphocytes T activés par un mécanisme d'AICD (Activating Induced Cell Death) qui contrôle l'homéostasie lymphocytaire. Sur les cellules leucémiques Jurkat (Fas+/TNF-R1+/DR5+), la cytotoxicité de ces deux lectines, dont les spécificités sont opposées (MorG interagirait avec la *O*-glycosylation et MorM avec la *N*-glycosylation), (1) est majoritairement apoptotique, et (2) fait intervenir les caspases et les récepteurs de mort, impliquant une signalisation FADD-dépendante. Cette famille de récepteur est composée du TNF-R (Tumor Necrosis Factor Receptor), du Fas (récepteur au ligand Fas ou FasL) et du récepteur à TRAIL (TNF Related Apoptosis Inducing Ligand). Expérimentalement, la toxicité de MorG semble faire intervenir le récepteur DR5 (ou TRAIL-R2), récepteur souvent surexprimé par les cellules tumorales [334], et seul récepteur FADD-dépendant uniquement *O*-glycosylé, exprimé par les cellules Jurkat. De plus, il a été rapporté que l'activité de ce récepteur vis-à-vis de son ligand est dépendante de la *O*-glycosylation [6]. De façon spéculative, il est probable que MorM interagisse avec le Fas ou le TNF-R1, qui sont uniquement *N*-glycosylés. Plus généralement, trois modes d'action de ces lectines sont à envisager. Le premier correspond à un effet direct sur les récepteurs de mort ou d'activation cellulaire. Le second est

un effet indirect qui entraîne la sécrétion de ligands d'activation ou de mort cellulaire. Le troisième mécanisme ferait intervenir l'endocytose des lectines. Après avoir pénétrer dans les cellules, il est possible que les lectines interagissent avec des molécules cytosoliques impliquées dans la mort ou l'activation cellulaire.

Une étude pharmacologique chez le petit animal est indispensable pour analyser les éventuels effets immunomodulateurs et hépatotoxiques, et pour déterminer les caractéristiques pharmacocinétiques de ces lectines (clearance et biodistribution). Il est intéressant de noter que lors de la production d'anticorps anti-MorG chez le lapin, la lectine a été injectée à raison de 100 µg tous les 10 jours pendant 6 mois. Chaque lapin a ainsi reçu environ 1,8 mg de lectine. Les animaux n'ont présenté aucun symptôme correspondant à une éventuelle toxicité de la lectine.

Les effets biologiques devront également être approfondis afin de déterminer le potentiel de ces lectines en biomédecine. Par exemple, MorM semble induire de l'AICD. Ainsi, l'étude de ses effets biologiques pourraient être élargies à divers modèles pathologiques liés à une dérégulation du système immunitaire, comme par exemple les maladies auto-immunes. De même, la cytotoxicité de MorG semble faire intervenir le récepteur TRAIL-R2, récepteur souvent surexprimé par les cellules cancéreuses. Ainsi, il pourrait être intéressant d'étudier les effets de MorG sur diverses lignées cellulaires cancéreuses.

D'autre part, nous avons évalué la possibilité d'utiliser MorG comme molécule vectrice en photochimiothérapie. Cette technique semble être très prometteuse dans le traitement de tumeurs solides accessibles par endoscopie (PDT) [188] ou de certaines pathologies hématologiques (ECP) [190]. L'atout principal de cette méthodologie est le peu d'effets secondaires qu'elle induit. De plus, elle peut également, dans certaines conditions, activer les défenses immunes anticancéreuses. Son principe thérapeutique est basé sur l'action conjointe d'une molécule photosensible (PS), de l'oxygène et de la lumière. Les PS ont la particularité d'être non toxiques en absence de lumière. En PDT, l'effet photodynamique peut avoir lieu au niveau de la tumeur ou de sa vascularisation, selon la localisation du PS et/ou de la localisation de sa photo-activation. En ECP, la technique actuelle repose sur la photo-addition de dérivés du Psoralène au niveau des constituants cellulaires, après irradiation par les UV-A. La photo-addition provoque la mort cellulaire. L'effet thérapeutique est dû au fait que les lymphocytes activés semblent plus sensibles au traitement que les lymphocytes naïfs [209]. De plus, la réinjection des cellules mortes (nécrotiques ou apoptotiques) favorise l'activation d'une réponse immunitaire spécifique. La phagocytose des cellules mortes

permettrait aux cellules présentatrices d'antigènes d'activer une réponse lymphocytaire cytotoxique [208]. Cependant, dans les deux cas (PDT et ECP), une voie importante d'étude est d'optimiser le ciblage des PS afin d'améliorer les résultats et d'élargir les applications. Ces nouveaux PS sont dits de 3<sup>ème</sup> génération [216].

Par conséquent, un conjugué covalent de MorG et de la porphyrine [5-(4-(5-carboxy-1-butoxy)-phényl)-10,15,20-tris(4-N-méthyl)-pyridiniumyl)] (TrMPyP) a été préparé, caractérisé et testé sur la lignée leucémique Jurkat. Le conjugué TrMPyP-MorG (1) est internalisé rapidement (5 min) par les cellules Jurkat, (2) augmente très fortement l'activité phototoxique de TrMPyP (DL50 de TrMPyP-MorG = 5 nM ; DL50 de TrMPyP = 15 µM), par l'intermédiaire d'un processus dépendant de la O-glycosylation, (3) induit une mort cellulaire majoritairement caspase indépendante, (4) est capable d'éliminer spécifiquement les cellules leucémiques T Jurkat (Tn-positives) mélangées à des lymphocytes T sains (Tn-négatifs), en préservant le potentiel fonctionnel des lymphocytes sains. De façon intéressante, après irradiation, le conjugué TrMPyP-MorG est capable d'entraîner un effet cytotoxique sur différentes lignées cellulaires leucémiques d'origine myéloïde ou lymphoïde et sur des cellules tumorales fraîches provenant de patients atteints de leucémies lymphoïdes aiguës ou chroniques. De plus, dans un objectif de traitement de tumeurs solides, nous avons couplé, de façon covalente, différents PS (TPPS ou porphyrine [*meso*-tetra(4-sulfonatophényl)], Chle6 ou [Chlorine e6], AlPcS4 ou phtalocyanine [Al(III)-tétrasulfonate]) à MorG. La Chle6 et l'AlPcS4 sont plus adaptés au traitement PDT puisque ces PS sont activables par la lumière rouge qui a la propriété de pénétrer dans les tissus. Les résultats montrent que la conjugaison covalente permet d'augmenter l'efficacité toxique de tous les PS testés sur la lignée leucémique Jurkat.

Concernant les perspectives de travail, il serait intéressant de déterminer le type de mort et la signalisation impliquée dans la phototoxicité des conjugués PS-MorG, les compartiments subcellulaires dans lesquels la lectine est acheminée et par quel(s) mécanisme(s) les conjugués pénètrent dans les cellules cibles. Les perspectives les plus attractives concernent l'étude du traitement photodynamique de tumeurs implantées chez le petit animal par les conjugués PS-MorG. Deux orientations peuvent être prises en compte : le traitement ECP de pathologies hématologiques, telles que les leucémies, et le traitement PDT de tumeurs solides, telles que les cancers colorectaux. Des expériences préliminaires montrent que le conjugué TrMPyP-MorG est capable d'éliminer efficacement *in vitro* des cellules de leucémie murine EL-4. Une étude *in vivo* de transfert de mélange de cellules EL-4 et de lymphocytes murins après traitement ECP en lumière visible ( $\lambda_{exc} = 400-800$  nm) avec le

conjugué TrMPyP-MorG pourrait être entreprise. De plus, des résultats préliminaires utilisant la lectine couplée à FITC ou à l'Alexa montrent : (1) qu'elle ne présente pas de toxicité aiguë en *i.v.* jusqu'à 500 µg/souris (non évaluée au-delà), (2) qu'elle permet la photodétection de cellules tumorales injectées en sous-cutané. Ainsi, le ciblage de tumeurs Tn-positives par MorG pourrait être évalué en imagerie *in vivo* chez le petit animal.

En ce qui concerne les perspectives à plus long terme du traitement photochimiothérapeutique ciblé par des lectines végétales, il pourrait être intéressant d'individualiser les traitements. Le cancer présente des particularités génomiques et par conséquent phénotypiques différentes selon les types de cancer et les individus. Ainsi, il est exclu de trouver un TACA exprimé par tous les cancers, et donc utopique de choisir une seule lectine pour le ciblage de tous types de cancer. Il pourrait donc être intéressant de créer un panel de conjugués PS-lectine dont les spécificités glycaniques sont dirigées vers les différents TACAs mis en évidence. Après une biopsie tumorale ou prélèvement sanguin, il serait possible de déterminer par cytométrie en flux ou microscopie confocale, en utilisant des lectine couplées à des fluorochromes, la lectine la plus adaptée. Ainsi, le conjugué dont la lectine est la plus affine pour le TACA surexprimé par la tumeur serait sélectionné. De plus, il existe une banque de données sur les lectines (Cancer Lectin Data Bank ; <http://proline.physics.iisc.ernet.in/cancerdb/about.html>) dans laquelle sont recensées les différentes lectines de la littérature scientifique qui ont été associées au cancer. Le principe de cette base est de centraliser toutes les données obtenues sur leurs structures, leurs spécificités et leurs potentiels effets biologiques. Cette banque pourrait dans un premier temps orienter le choix des lectines les plus adaptées au ciblage de tumeurs. Toutefois, l'approbation médicale doit être faite pour les différents PS, lectines et conjugués PS-lectine potentiellement intéressants pour le ciblage et le traitement de cancers, ce qui suggère qu'un grand nombre d'études pharmacologiques et pharmacocinétiques doit être réalisé.

Enfin, comme certaines lectines présentent des effets anticancéreux (effets cytotoxiques et immunomodulateurs), l'effet photodynamique du PS pourrait être synergique avec le vecteur lectinique.

En conclusion, même si des études supplémentaires sont nécessaires, les lectines du mûrier noir semblent être intéressantes pour améliorer le ciblage de médicaments mais également comme molécule à activité pharmacologique. Dans les deux cas, elles pourraient être utilisées en médecine vis-à-vis de pathologies associées à des défauts de la glycosylation.



## **V MATERIEL ET METHODES:**





## **V-1 Lectines :**

Morniga G et Morniga M ont été extraites et purifiées à partir de l'écorce du mûrier noir ou *Morus nigra* [176]. MorG et MorM sont solubilisées à 1 mg/mL en présence de 20 mM de  $\alpha$ -D-Galactose dans une solution de borate 50 mM pH 8,5. Le FITC (Acros Organics, Fisher Scientific, Illkirch, France) est solubilisé à 10 mg/mL dans une solution de Diméthylfluorure (DMF). 62  $\mu$ L de la solution de FITC sont ensuite ajoutés à 1 mL de solution de lectine 1 mg/mL. Une dialyse est ensuite réalisée dans une cassette à dialyse Slide-A-Lyzer® (10,000 MWCO, 0.5-3mL ; Pierce, ) contre du PBS 20 mM pH 7,4. La dialyse est effectuée pendant 4 à 5 jours en prenant soin de changer le PBS deux fois par jour.

## **V-2 Cultures et lignées cellulaires leucémiques humaines :**

### ***V-2-1 Lignées leucémiques :***

Différentes lignées leucémiques humaines ont été utilisées pour ce travail :

- les cellules Jurkat parentales (clone A3) et ses lignées dérivées déficientes pour des protéines impliquées dans l'apoptose telles que le clone I2-1 (ou  $\Delta$ FADD, déficitaire pour la protéine FADD) [335], le clone I9-2e (ou  $\Delta$ casp-8/10, doublement déficitaire pour les caspases 8 et 10 [336]) obtenu après dilution limite du clone I9-2 ( $\Delta$ casp-8, déficitaire pour la caspase-8 [337]), fourni par le Dr. J. Blenis (Boston, USA), la lignée Jurkat E6-1 transfectée par un vecteur permettant la surexpression de Bcl-xL (lignée Bcl-xL), le clone JMR (ou  $\Delta$ casp-9, déficitaire pour la caspase-9 [338]).

- les lignées leucémiques T lymphoïdes Molt-4, CEM et de Sézary Hut78.

- les lignées leucémiques aiguës myéloblastiques KG1, KG1a, HL-60, K562 et U937.

- les lignées lymphoblastiques B transformées par le virus Epstein-Barr (EBV) ERG et SKW6.4. La lignée ERG provient de lymphocytes B de patient sain et a été transformée au laboratoire.

Toutes ces lignées cellulaires sont cultivées à 37°C, en atmosphère humide et en présence de 5% de CO<sub>2</sub> dans du milieu RPMI 1640 (+Glutamax) (Gibco, Cergy-Pontoise, France) contenant 10% de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté (Eurobio).

## ***V-2-2 Lymphocytes T humains du sang périphérique :***

Les cellules mononucléées du sang périphérique sont isolées sur gradient de Ficoll (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) à partir de sang de donneurs sains. Les lymphocytes T sont purifiés à l'aide du cocktail Rosette Sep d'enrichissement en lymphocytes T (StemCell Technologies, Grenoble, France) (Benoist et al., JLB, 2009). Les lymphocytes T sont activés par un mélange d'anticorps anti-CD3 (clone OKT3, 1 µg/mL), d'IL-2 (Sanofi-Synthélabo ; 20 unités/mL) et d'anticorps anti-CD28 ( ) dans du milieu RPMI 1640 (+Glutamax) contenant 10% SVF.

## **V-3 Couplage covalent de PS à MorG**

### ***V-3-1 Chimie du couplage et purification :***

La porphyrine TrisMPyP ou TrMPyP [5-(4-(5-carboxy-1-butoxy)-phényl)-10,15,20-tris(4-N-méthyl)-pyridiniumyl)] a été synthétisée [339]. Puis, son ester activé par le N-hydroxysuccinimide (NHS) a été préparé, purifié par précipitation dans le chloroforme (CHCl<sub>3</sub>) et dissout dans le Diméthylsulfoxyde (DMSO). Morniga G (1 mg/mL) a été dissoute en tampon borate 50 mM pH 8,5 contenant 50 mM de α-D-galactose puis mélangée avec l'ester activé NHS-TrMPyP (30 mg/mL) pendant 24 h à 37 °C et à l'obscurité. Différents ratios TrMPyP/MorG (10, 30, 100 et 200) ont été utilisés et les conjugués résultants ont été dialysés contre la solution tampon. Les concentrations et les ratios de chacun des constituants des conjugués ont été déterminés par spectroscopie d'absorbance UV-visible. La quantification en Morniga G a été mesurée par le kit micro BCA (Pierce, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA). La quantification de TrMPyP a été déterminée au pic d'absorption de ce composé (434 nm; ε=200 000 cm<sup>-1</sup>M<sup>-1</sup>).

### ***V-3-2 Caractérisation structurale des conjugués :***

Les conjugués PS-MorG ont tout d'abord été analysés par électrophorèse dénaturante (SDS-PAGE). Les gels de concentration et de séparation sont respectivement de 4,8 % et 15 % de polyacrylamide. Chaque échantillon contient du tampon de loading (Tris HCl pH 6,8 0,3 M, SDS 10 %, Glycérol 40 %, bleu de Bromophénol 0,02 %, 10 % β-Mercaptoéthanol). La migration est effectuée à ampérage constant 20mA dans un tampon de migration Tris-Glycine. Après migration, les protéines sont fixées dans un mélange éthanol/acide

acétique/eau (40/10/50) pendant 30 minutes. Les gels sont scannés avant et après coloration au bleu de Comassie. La coloration est effectuée avec du bleu de Comassie R250 0,1% dans un mélange éthanol/acide acétique/eau (25/8/67) pendant 30 minutes. Ensuite, la décoloration est effectuée dans le tampon de décoloration. La coloration naturelle des PS permet leur visualisation en lumière visible. La coloration au bleu de Comassie permet de détecter la présence de la partie protéique, *i.e.* MorG.

Les conjugués ont également été analysés à l'aide d'un spectromètre de masse de type MALDI-TOF (Applied Biosystems Inc., Framingham, MA, USA) en mode linéaire. La matrice utilisée est une solution d'acide sinapinique en acétonitrile et TFA (30 % / 0,1 %). Les échantillons ont été préparés en les mélangeant dans un rapport 1/1 avec la matrice. Ce mélange est déposé sur une plaque pour MALDI et séché. L'acquisition et la calibration sont réalisées grâce au logiciel Voyager (BioSpectrometry).

### **V-3-3 Tests d'hémagglutination**

La spécificité de MorG et des conjugués a été évaluée par leur capacité à agglutiner les hématies. Tout d'abord, leurs titres hémagglutinants ont été déterminés pour chacun des conjugués et comparés à celui de MorG. Ces titres représentent la concentration minimale en lectine qui permet l'agglutination d'hématies. Ils sont utilisés pour les expériences d'inhibition de l'hémagglutination. Pour cela, 50  $\mu$ L de MorG ou de conjugué TrMPyP-MorG sont incubés en plaque 96 puits. Des dilutions en cascade au 1/2 des solutions protéiques sont réalisées à partir de 1 mg/mL (puits n°2) jusqu'à 0,12 ng/mL (puits n°24). 50  $\mu$ L de globules rouges humains dilués à 1 % en NaCl 9 ‰ sont déposés dans chacun des puits. La lecture des résultats se fait après 2 h d'incubation à température ambiante. Le titre correspond à l'avant-dernier puit qui présente une hémagglutination (présence d'un voile franc).

Les expériences d'inhibition de l'hémagglutination sont également réalisées en plaque 96 puits. 50  $\mu$ L de NaCl 9 ‰ sont déposés dans chaque puit. Une série de dilutions en cascade au 1/2 avec 50  $\mu$ L de solution sucrée est ensuite réalisée entre 200 mM (puits n°2) et 95 nM (puits n°23). Ensuite, 50  $\mu$ L des solutions de MorG ou de TrMPyP-MorG sont déposés dans chaque puit à la concentration correspondant au titre hémagglutinant. Enfin, 50  $\mu$ L de solution de globules rouges humains à 1 % dans NaCl 9 ‰ sont distribués dans chaque puits. La plaque est incubée 2 h à température ambiante. Les résultats correspondent à la concentration minimale en sucre provoquant l'inhibition de l'hémagglutination et permettent de comparer la spécificité de MorG à celle des conjugués.

## **V-4 Interaction et endocytose des lectines et des conjugués**

Les cellules ( $10^6$  /mL) sont incubées en présence de FITC-MorG, de FITC-MorM ou de TrMPyP-MorG à 4°C ou 37°C, en présence ou en absence d' $\alpha$ -D-Glucose,  $\alpha$ -D-Mannose,  $\alpha$ -D-Galactose, N-acetyl- $\alpha$ -D-galactosamine ( $\alpha$ GalNAc), Mannan, Lactoferrine, Mucine Bovine Submaxillaire (Sigma-Aldrich, L'Isle d'Abeau Chesnes, France) et d'antigène Tn (Dextra Laboratories, Reading, UK), lavées en PBS et analysées par cytométrie en flux. L'analyse cytofluorimétrique des conjugués marqués au FITC et à TrMPyP ont respectivement été réalisées sur un cytomètre FACS Calibur (BD Biosciences, Le Pont-de-Claix, France) et un cytomètre LSRII (BD Biosciences, excitation: 405nm; détection: 660 $\pm$ 20nm).

Pour la microscopie confocale, les cellules ont également été marquées avec du 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Les images ont été acquises sur un microscope CLSM-SP2 (Leica, Mannheim, Germany). Les longueurs d'onde d'excitation/émission utilisées pour le DAPI, le FITC et la porphyrine TrMPyP sont respectivement de 405/410-470, 488/500-550 et 458/650-700 nm.

Pour la microscopie électronique, des anticorps anti-MorG produits chez le lapin sont utilisés pour la détecter la localisation subcellulaire de MorG après endocytose.

## **V-5 Activité immunostimulante des lectines**

### ***V-5-1 Test de prolifération lymphocytaire :***

Les cellules (pbmc ou lymphocytes T purifiés) sont incubées avec Morniga G, Morniga M, artocarpin, ou Con A à différentes concentrations (0,312 à 20  $\mu$ g/mL) et pendant différentes cinétiques, i.e. 24, 48 et 72 h. Pour certaines expériences, les lectines ont été incubées les 3 ou 6 premières heures, les cellules lavées en présence d' $\alpha$ ,D-mannopyrannose puis réincubées. Pour les expériences aux doses submitogéniques des lectines, les cellules ont été co-incubées en présence d'anticorps anti-CD28 (1  $\mu$ g/mL; clone L283, Becton Dickinson) ou de PMA (0.3 ng/mL ; Sigma-Aldrich). La [3H]thymidine (5  $\mu$ Ci/ $10^5$  cellules; ICN, Orsay, France) est ajoutée 16 h avant la fin de l'incubation. La radio-activité est mesurée par par

comptage liquide de scintillation (Harvester 96 Tomtec, Wallac-EG&G Instruments, Evry, France). Les indexes de prolifération sont calculés à partir du ratio moyen comptage/min (cpm) de l'essai par rapport au témoin.

### ***V-5-2 Test d'activation lymphocytaire :***

Les cellules sont incubées pendant 72 h en présence des lectines à la concentration correspondant à leur pic de prolifération, i.e 5 µg/mL (0.075 µM) pour MorM, 10µg/mL (0,15 µM) pour MorG, 10 µg/mL (0.15 µM) pour la Con A, et 20 µg/mL (0.3 µM) pour l'Artocarpine. Les cellules sont ensuite lavées, incubées 30 min à 4°C en présence de lectine-FITC et d'anticorps monoclonaux couplés à différents fluorochromes, i.e. anti-CD3, anti-CD4 et anti-CD8 (marqueurs des LT ; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), anti-CD19 (marqueur des LB ; Dako, Glostrup, Denmark), anti-CD56 et CD71 (marqueur des cellules NK ; PharMingen, San Diego, CA, USA), anti-CD25 (marqueur d'activation ; PharMingen, San Diego, CA, USA), et anti-CTLA4 (marqueur des LT régulateurs ; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), et analysées par cytométrie en flux (FACS Calibur ; BD Biosciences, Le Pont-de-Claix, France).

## **V-6 Activité toxique des lectines et des conjugués**

### **TrMPyP-MorG :**

#### ***V-6-1 Techniques :***

##### **Test d'exclusion au bleu Trypan :**

Avant chaque expérience, la viabilité cellulaire est déterminée par le test d'exclusion au bleu Trypan (Gibco). La proportion de cellules mortes est évaluée par observation sur une lame de Malassez d'un aliquot de culture cellulaire dilué volume à volume dans une solution de Bleu Trypan (0,4 % dans du PBS). Le pourcentage de cellules nécrotiques (colorées en bleu) est évalué.

### **Test MTT :**

Le MTT ((ou Bromure de 3(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium (de couleur jaune) ; Euromedex, Souffelweyersheim, France) est incubé dans le milieu de culture à une concentration finale de 0,5 mg/mL pendant 2 h à 37°C. Les cellules viables forment des cristaux de formazan (bleus) grâce aux enzymes mitochondriales. Après dissolution des cristaux par 100 µL d'une solution de HCl 0,01N / SDS 10 %, une lecture spectrophotométrique à 590 nm est réalisée. Les densités optiques obtenues sont directement proportionnelles au nombre de cellules vivantes. Les effets cytotoxiques sont calculés par le pourcentage de viabilité après traitement, par rapport au 100 % correspondant aux cellules contrôle.

### **Test AnnexineV-FITC / Iodure de Propidium :**

Une quantification de l'apoptose est réalisée après marquage des cellules par l'Annexine V-FITC (AV) et l'iodure de propidium (IP) (Kit Annexin V-FITC, Abcys SA, Paris, France). Les cellules sont centrifugées et incubées 10 minutes à 4°C en présence d'AV et d'IP avant d'être analysées par cytométrie en flux (FACS Calibur, BD Biosciences, San Diego, CA, USA). Le pourcentage de cellules apoptotiques qui présentent une externalisation des phosphatidylsérines, marquées par l'AV, ainsi que la proportion de cellules nécrosées, marquées par l'IP, sont évalués. Il est à noter que les cellules nécrosées sont aussi marquées par l'AV. Ainsi, les cellules apoptosées et nécrosées sont respectivement AV + / IP- et AV+ / IP+.

### **Analyse morphologique :**

Les cellules sont incubées pendant 15 minutes à 37°C à l'abri de la lumière en présence de 2 µg/ml d'iodure de propidium (Sigma), un marqueur des cellules nécrosées présentant un trouble de la perméabilité membranaire et avec 2,5 µM de Syto13 (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA), une sonde perméante colorant le noyau et le cytoplasme des cellules en se fixant sur les acides nucléiques. 100000 cellules sont ensuite déposées entre lame et lamelle avant observation au microscope à fluorescence (Olympus, SELI, Toulouse, France). Les cellules présentant une condensation ou une fragmentation nucléaire sont considérées comme apoptosées. Les cellules marquées à l'iodure de propidium sont nécrosées.

## **V-6-2 Toxicité des lectines :**

L'évaluation de la toxicité des lectines sur les différentes lignées cellulaires a été réalisée par la méthode MTT et par cytométrie en flux. Les cellules ( $2 \cdot 10^6$ /mL) sont pré-incubées 1 h en présence de z-VAD(OMe)-fmk ( $20 \mu\text{M}$ ; Bachem), ou de benzyl- $\alpha$ GalNAc (concentration ; fournisseur), ou d'anticorps neutralisant le DR4 (concentration ; clone B-N36 ; Diaclone), le DR5 (concentration ; clone B-K29 ; Diaclone), le Fas (concentration ; clone SM1/23 ; Bender MedSystems), ou le TRAIL (concentration ; clone B-T24 ; Diaclone). Ces cellules ( $10^6$ /mL) sont ensuite incubées en présence MorG ( $5\text{-}20 \mu\text{g}/\text{mL}$ ), ou MorM ( $5\text{-}20 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) ou FasL ( $50 \text{ ng}/\text{mL}$  ; murin ou humain ; ), ou TRAIL ( $50 \text{ ng}/\text{mL}$  ; humain ; ) ou TNF $\alpha$  ( $50 \text{ ng}/\text{mL}$  ; humain ; ). La viabilité cellulaire est analysée par la méthode MTT, et la mort cellulaire par marquage AV/IP et Syto 13/IP.

## **V-6-3 Activité phototoxique des conjugués PS-MorG**

Les cellules ( $10^6$  /mL) sont incubées en présence de MorG, de PS libres ou de conjugués PS-MorG additionnés ou non à des solutions inhibitrices de sucre ou de glycoprotéine pendant 15 min à  $37^\circ\text{C}$  et à l'obscurité en milieu RPMI-1640. Les différents PS utilisés sont TrMPyP (5-(4-(5-carboxy-1-butoxy)-phenyl)-10,15,20-tris(4-N-methyl-pyridiniumyl)-porphyrin, synthétisée au Laboratoire de Chimie de Coordination, Toulouse), TPPS (Tetrasodium-*meso*-tetra(4-sulfonatophenyl)porphyrin dodecahydrate, Frontier Scientific Inc.), Chle6 (Chlorine e6, Frontier Scientific Inc.), AlPcS4 (Al(III)-tetrasulfonatophthalocyanine chloride, Frontier Scientific Inc.). Les conjugués TPPS-MorG, Chle6-MorG et AlPcS4 ont été préparés et caractérisés comme décrits (Article 5). Les cellules sont lavées, puisensemencées en plaque à  $10^6$  /mL en milieu RPMI-SVF 10%-PS 1%. Les plaques sont ensuite irradiées en lumière blanche par une banque de quatre tubes fluorescents (Philips master TL-D 18W/840) ou en lumière rouge (système de LED fixées sur plaque de culture;  $\lambda$  émission 660 nm) pour différentes cinétiques [ (dose lumineuse ( $\text{J}/\text{cm}^2$ ) = puissance lumineuse (W) x temps (s) ]. La viabilité cellulaire est évaluée par le test MTT, la mort cellulaire est analysée par marquage AV/IP ou Syto 13/IP.

Pour les mélanges de lymphocytes T sains et de cellules Jurkat traités par PCT avec le conjugué TrMPyP-MorG, le pourcentage de chaque type cellulaire est évalué avant ou après

traitement par cytométrie en flux. Les cellules sont différenciées par leurs paramètres de taille et de marquage par un anticorps anti-CD1d (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA). Les lymphocytes T sains sont de petite taille et négatifs pour le marquage, alors que les cellules Jurkat sont de plus grandes taille et positives au marquage. Pour certaines expériences, 24 h après traitement PCT, le mélange cellulaire a été incubé 48 h avec des anticorps monoclonaux anti-CD28 (1 µg/mL ; clone L283, Becton Dickinson), et anti-CD3 (10 ng/mL ; Orthoclone, Janssen-Cilag, Issy-les-Moulineaux, France) en présence d'Interleukin-2 (100 UI/ml ; BD Pharmingen). Puis, l'activation des lymphocytes sains a été évaluée par cytométrie en flux et marquage à l'anticorps anti-CD25 (BD Pharmingen), dans la fenêtre correspondant à la population cellulaire CD3<sup>+</sup>/CD1d.

## **V-7 Mécanismes intracellulaires induits par les lectines et par les conjugués PS-MorG**

### ***V-8-1 Western blot (Caspases)***

#### *Extraits protéiques totaux :*

De  $5 \cdot 10^6$  à  $20 \cdot 10^6$  cellules sont soniquées dans un tampon de lyse [Hepès (10m M ; pH 7,4 ), Glycérol (10 %), Triton X-100 (10 mM), DOC (Acide Desoxycholique, 0.5 %), NaVO<sub>4</sub> (1 mM), β-glycero-phosphate (10 mM), NaF (50 mM), leupeptine (2 µg/mL), pepstatine (2 µg/mL), aprotinine (10 µg/mL), PMSF (1 mM)]. Après une centrifugation de 10 minutes à 10000 rpm à 4 °C, les surnageants sont récupérés et les protéines sont dosées selon la méthode de Bradford (Biorad). Les extraits protéiques sont finalement dénaturés par chauffage à 95 °C en présence de Bleu de Bromophénol et de β-mercaptoéthanol.

#### *Migration électrophorétique des extraits protéiques*

De 20 à 50 µg d'extraits protéiques sont déposés sur un gel SDS-PAGE (12 ou 15 %) puis transférés sur une membrane de nitrocellulose. Les membranes sont hybridées en présence des anticorps primaires puis des anticorps secondaires couplés à la Peroxidase (Jackson ImmunoResearch). Les anticorps utilisés sont les anticorps de souris anti-PARP, anti-caspase 9, anti-Caspase 3 (Cell signaling Technology, Danvers, MA, USA) ou anti-β actine (Sigma). Des anticorps secondaires anti-souris couplés à Hrp ont ensuite été utilisés.



pour la détection des anticorps primaires. Les protéines extraites des cellules Jurkat traitées par FasL ont servi de contrôle. La révélation est effectuée par chimiluminescence à l'aide d'un kit ECL (Perbio).

## **V-8-2 Dosage du céramide**

### *Extraction lipidique :*

Les culots cellulaires sont repris par 200 µL d'eau distillée et homogénéisés par sonication. 30 µL sont conservés pour le dosage protéique par la méthode de Bradford. 850 µL de chloroforme/méthanol (2:1, v/v) sont ajoutés au 170 µL d'extraits restant. Après mélange et centrifugation à 2500 rpm pendant 15 min, la phase inférieure est récupérée et lavée avec une phase supérieure synthétique constituée de chloroforme/méthanol/eau (3 :48 :47, v/v/v), puis évaporée sous azote.

### *Dosage du céramide (méthode de la DAG kinase) :*

Le principe de la méthode repose sur la capacité de la DAG kinase à phosphoryler le DAG et le céramide. Les extraits lipidiques sont solubilisés par 40 µL de solution détergente (dioléoyl-phosphatidyl-glycérol/octyl-b-glucoside), vortexés, soniqués et incubés en présence de DAG Kinase d'E.coli (isolée à partir de bactéries fournies par les Drs. D. Perry et Y.A. Hannun (Charleston, SC)) et d'ATP $\gamma$ P32 à température ambiante pendant 30 min. La réaction est stoppée par l'addition de 250 µL d'eau contenant 1 % d'acide perchlorique, 400 µL de chloroforme et 400 µL de méthanol. Une centrifugation à 2500 rpm pendant 10 min permet d'isoler la phase inférieure contenant le céramide-1-phosphate et l'acide phosphatidique. La phase inférieure est ensuite évaporée sous azote puis solubilisée par 60 µL de chloroforme/méthanol (2:1, v/v). 20 µL de cet extrait sont séparés sur une plaque de silice dans un système de migration contenant chloroforme/acétone/méthanol/acide acétique/eau (50:20:15:10:5, v/v/v/v/v). Les bandes correspondant au céramide-1-phosphate et à l'acide phosphatidique sont révélées par autoradiographie, grattées et comptées par scintillation.

## **V-8-3 Dosage des ROS**

Les cellules sont préincubées en présence de la sonde H<sub>2</sub>DCFDA pendant 30 min (10 µM ; Invitrogen, Cergy Pontoise, France), puis traitées par les conjugués PS-MorG et irradiées. La

sonde oxydée par la production de ROS devient fluorescente et peut être détectée par cytométrie en flux [340].

## **V-9 Tests statistiques :**

Les expérimentations réalisées au minimum 3 fois sont représentées sous forme de moyennes arithmétiques avec des barres d'erreurs correspondant à l'erreur standard de la moyenne. La significativité statistique est déterminée par un test de t (test de Student) et une valeur de P inférieure à 0,05 est considérée comme significative.

## **BIBLIOGRAPHIE :**



1. Brooks SA, Carter TM, Royle L, Harvey DJ, Fry SA, et al. (2008) Altered glycosylation of proteins in cancer: what is the potential for new anti-tumour strategies. *Anticancer Agents Med Chem* 8: 2-21.
2. Langer R (2001) Drug delivery. *Drugs on target. Science* 293: 58-59.
3. Hanisch FG (2001) O-glycosylation of the mucin type. *Biol Chem* 382: 143-149.
4. Ohtsubo K, Marth JD (2006) Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell* 126: 855-867.
5. Charlier E, Conde C, Zhang J, Deneubourg L, Di Valentin E, et al. (2010) SHIP-1 inhibits CD95/APO-1/Fas-induced apoptosis in primary T lymphocytes and T leukemic cells by promoting CD95 glycosylation independently of its phosphatase activity. *Leukemia* 24: 821-832.
6. Wagner KW, Punnoose EA, Januario T, Lawrence DA, Pitti RM, et al. (2007) Death-receptor O-glycosylation controls tumor-cell sensitivity to the proapoptotic ligand Apo2L/TRAIL. *Nat Med* 13: 1070-1077.
7. Guillot J, Guerry M, Konska G, Caldefie-Chezet F, De Latour M, et al. (2004) [Modification of glycoconjugates during the carcinogenesis: the case of mammary carcinomas]. *Bull Cancer* 91: 141-158.
8. Martinez-Duncker I, Mollicone R, Codogno P, Oriol R (2003) The nucleotide-sugar transporter family: a phylogenetic approach. *Biochimie* 85: 245-260.
9. Lau KS, Partridge EA, Grigorian A, Silvescu CI, Reinhold VN, et al. (2007) Complex N-glycan number and degree of branching cooperate to regulate cell proliferation and differentiation. *Cell* 129: 123-134.
10. Trombetta ES, Helenius A (1998) Lectins as chaperones in glycoprotein folding. *Curr Opin Struct Biol* 8: 587-592.
11. Schachter H (2000) The joys of HexNAc. The synthesis and function of N- and O-glycan branches. *Glycoconj J* 17: 465-483.
12. Wopereis S, Lefeber DJ, Morava E, Wevers RA (2006) Mechanisms in protein O-glycan biosynthesis and clinical and molecular aspects of protein O-glycan biosynthesis defects: a review. *Clin Chem* 52: 574-600.
13. Brockhausen I, Schachter H, Stanley P (2009) O-GalNAc Glycans. *Essentials of Glycobiology*.
14. Brockhausen I, Moller G, Merz G, Adermann K, Paulsen H (1990) Control of mucin synthesis: the peptide portion of synthetic O-glycopeptide substrates influences the activity of O-glycan core 1 UDPgalactose:N-acetyl-alpha-galactosaminyl-R beta 3-galactosyltransferase. *Biochemistry* 29: 10206-10212.
15. Akama TO, Nakagawa H, Sugihara K, Narisawa S, Ohyama C, et al. (2002) Germ cell survival through carbohydrate-mediated interaction with Sertoli cells. *Science* 295: 124-127.
16. Zhao Y, Sato Y, Isaji T, Fukuda T, Matsumoto A, et al. (2008) Branched N-glycans regulate the biological functions of integrins and cadherins. *Febs J* 275: 1939-1948.
17. Zhao Y, Nakagawa T, Itoh S, Inamori K, Isaji T, et al. (2006) N-acetylglucosaminyltransferase III antagonizes the effect of N-acetylglucosaminyltransferase V on alpha3beta1 integrin-mediated cell migration. *J Biol Chem* 281: 32122-32130.
18. Iijima J, Zhao Y, Isaji T, Kameyama A, Nakaya S, et al. (2006) Cell-cell interaction-dependent regulation of N-acetylglucosaminyltransferase III and the bisected N-glycans in GE11 epithelial cells. Involvement of E-cadherin-mediated cell adhesion. *J Biol Chem* 281: 13038-13046.
19. Gu J, Taniguchi N (2004) Regulation of integrin functions by N-glycans. *Glycoconj J* 21: 9-15.

20. Rosen SD (2004) Ligands for L-selectin: homing, inflammation, and beyond. *Annu Rev Immunol* 22: 129-156.
21. Sperandio M, Gleissner CA, Ley K (2009) Glycosylation in immune cell trafficking. *Immunol Rev* 230: 97-113.
22. Lowe JB (2002) Glycosylation in the control of selectin counter-receptor structure and function. *Immunol Rev* 186: 19-36.
23. Stone EL, Ismail MN, Lee SH, Luu Y, Ramirez K, et al. (2009) Glycosyltransferase function in core 2-type protein O glycosylation. *Mol Cell Biol* 29: 3770-3782.
24. Toma J, Weinheimer SP, Stawiski E, Whitcomb JM, Lewis ST, et al. (2011) Loss of Asparagine-Linked Glycosylation Sites in Variable Region Five of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope is Associated with Resistance to CD4 Antibody Ibalizumab. *J Virol*.
25. McCaffrey RA, Saunders C, Hensel M, Stamatatos L (2004) N-linked glycosylation of the V3 loop and the immunologically silent face of gp120 protects human immunodeficiency virus type 1 SF162 from neutralization by anti-gp120 and anti-gp41 antibodies. *J Virol* 78: 3279-3295.
26. Strom AC, Weis K (2001) Importin-beta-like nuclear transport receptors. *Genome Biol* 2: REVIEWS3008.
27. Rondanino C, Bousser MT, Monsigny M, Roche AC (2003) Sugar-dependent nuclear import of glycosylated proteins in living cells. *Glycobiology* 13: 509-519.
28. Lefebvre T, Cieniewski C, Lemoine J, Guerardel Y, Leroy Y, et al. (2001) Identification of N-acetyl-d-glucosamine-specific lectins from rat liver cytosolic and nuclear compartments as heat-shock proteins. *Biochem J* 360: 179-188.
29. Guinez C, Morelle W, Michalski JC, Lefebvre T (2005) O-GlcNAc glycosylation: a signal for the nuclear transport of cytosolic proteins? *Int J Biochem Cell Biol* 37: 765-774.
30. Zhang L, Tran DT, Ten Hagen KG (2010) An O-glycosyltransferase promotes cell adhesion during development by influencing secretion of an extracellular matrix integrin ligand. *J Biol Chem* 285: 19491-19501.
31. Ransford GA, Fregien N, Qiu F, Dahl G, Conner GE, et al. (2009) Pannexin 1 contributes to ATP release in airway epithelia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 41: 525-534.
32. Penuela S, Bhalla R, Nag K, Laird DW (2009) Glycosylation regulates pannexin intermixing and cellular localization. *Mol Biol Cell* 20: 4313-4323.
33. Garin MI, Chu CC, Golshayan D, Cernuda-Morollon E, Wait R, et al. (2007) Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells. *Blood* 109: 2058-2065.
34. Earl LA, Bi S, Baum LG (2010) N- and O-glycans modulate galectin-1 binding, CD45 signaling, and T cell death. *J Biol Chem* 285: 2232-2244.
35. Stern HM, Padilla M, Wagner K, Amler L, Ashkenazi A (2010) Development of immunohistochemistry assays to assess GALNT14 and FUT3/6 in clinical trials of dulcanermin and drozitumab. *Clin Cancer Res* 16: 1587-1596.
36. Demetriou M, Granovsky M, Quaggin S, Dennis JW (2001) Negative regulation of T-cell activation and autoimmunity by Mgat5 N-glycosylation. *Nature* 409: 733-739.
37. Ma BY, Mikolajczak SA, Yoshida T, Yoshida R, Kelvin DJ, et al. (2004) CD28 T cell costimulatory receptor function is negatively regulated by N-linked carbohydrates. *Biochem Biophys Res Commun* 317: 60-67.
38. Li M, Song L, Qin X (2010) Glycan changes: cancer metastasis and anti-cancer vaccines. *J Biosci* 35: 665-673.
39. Reis CA, Osorio H, Silva L, Gomes C, David L (2010) Alterations in glycosylation as biomarkers for cancer detection. *J Clin Pathol* 63: 322-329.
40. Varki A, Kannagi R, Toole BP (2009) Glycosylation Changes in Cancer. *Essentials in glycobiology*.

41. Ueda K, Takami S, Saichi N, Daigo Y, Ishikawa N, et al. (2010) Development of serum glycoproteomic profiling technique; simultaneous identification of glycosylation sites and site-specific quantification of glycan structure changes. *Mol Cell Proteomics* 9: 1819-1828.
42. Bos PD, Zhang XH, Nadal C, Shu W, Gomis RR, et al. (2009) Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain. *Nature* 459: 1005-1009.
43. Park JH, Nishidate T, Kijima K, Ohashi T, Takegawa K, et al. (2010) Critical roles of mucin 1 glycosylation by transactivated polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 6 in mammary carcinogenesis. *Cancer Res* 70: 2759-2769.
44. Maupin KA, Sinha A, Eugster E, Miller J, Ross J, et al. (2010) Glycogene expression alterations associated with pancreatic cancer epithelial-mesenchymal transition in complementary model systems. *PLoS One* 5: e13002.
45. Wu C, Guo X, Wang W, Wang Y, Shan Y, et al. (2010) N-Acetylgalactosaminyltransferase-14 as a potential biomarker for breast cancer by immunohistochemistry. *BMC Cancer* 10: 123.
46. Zhu X, Jiang J, Shen H, Wang H, Zong H, et al. (2005) Elevated beta1,4-galactosyltransferase I in highly metastatic human lung cancer cells. Identification of E1AF as important transcription activator. *J Biol Chem* 280: 12503-12516.
47. Itzkowitz SH, Yuan M, Montgomery CK, Kjeldsen T, Takahashi HK, et al. (1989) Expression of Tn, sialosyl-Tn, and T antigens in human colon cancer. *Cancer Res* 49: 197-204.
48. Lin WM, Karsten U, Goletz S, Cheng RC, Cao Y (2010) Expression of CD176 (Thomsen-Friedenreich antigen) on lung, breast and liver cancer-initiating cells. *Int J Exp Pathol*.
49. Cazet A, Julien S, Bobowski M, Burchell J, Delannoy P (2010) Tumour-associated carbohydrate antigens in breast cancer. *Breast Cancer Res* 12: 204.
50. Cao Y, Merling A, Karsten U, Goletz S, Punzel M, et al. (2008) Expression of CD175 (Tn), CD175s (sialosyl-Tn) and CD176 (Thomsen-Friedenreich antigen) on malignant human hematopoietic cells. *Int J Cancer* 123: 89-99.
51. Danussi C, Coslovi A, Campa C, Mucignat MT, Spessotto P, et al. (2009) A newly generated functional antibody identifies Tn antigen as a novel determinant in the cancer cell-lymphatic endothelium interaction. *Glycobiology* 19: 1056-1067.
52. Brooks CL, Schietinger A, Borisova SN, Kufer P, Okon M, et al. (2010) Antibody recognition of a unique tumor-specific glycopeptide antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 10056-10061.
53. Sakai K, Yuasa N, Tsukamoto K, Takasaki-Matsumoto A, Yajima Y, et al. (2010) Isolation and characterization of antibodies against three consecutive Tn-antigen clusters from a phage library displaying human single-chain variable fragments. *J Biochem* 147: 809-817.
54. Schietinger A, Philip M, Yoshida BA, Azadi P, Liu H, et al. (2006) A mutant chaperone converts a wild-type protein into a tumor-specific antigen. *Science* 314: 304-308.
55. Berois N, Mazal D, Ubillos L, Trajtenberg F, Nicolas A, et al. (2006) UDP-N-acetyl-D-galactosamine: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-6 as a new immunohistochemical breast cancer marker. *J Histochem Cytochem* 54: 317-328.
56. Barr N, Taylor CR, Young T, Springer GF (1989) Are pancarcinoma T and Tn differentiation antigens? *Cancer* 64: 834-841.
57. Tian E, Ten Hagen KG (2007) O-linked glycan expression during *Drosophila* development. *Glycobiology* 17: 820-827.

58. Akita K, Fushiki S, Fujimoto T, Inoue M, Oguri K, et al. (2001) Developmental expression of a unique carbohydrate antigen, Tn antigen, in mouse central nervous tissues. *J Neurosci Res* 65: 595-603.
59. Piller V, Piller F, Fukuda M (1990) Biosynthesis of truncated O-glycans in the T cell line Jurkat. Localization of O-glycan initiation. *J Biol Chem* 265: 9264-9271.
60. Aryal RP, Ju T, Cummings RD (2010) The endoplasmic reticulum chaperone Cosmc directly promotes in vitro folding of T-synthase. *J Biol Chem* 285: 2456-2462.
61. Ju T, Cummings RD (2002) A unique molecular chaperone Cosmc required for activity of the mammalian core 1 beta 3-galactosyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 16613-16618.
62. Ju T, Lanneau GS, Gautam T, Wang Y, Xia B, et al. (2008) Human tumor antigens Tn and sialyl Tn arise from mutations in Cosmc. *Cancer Res* 68: 1636-1646.
63. Ju T, Aryal RP, Stowell CJ, Cummings RD (2008) Regulation of protein O-glycosylation by the endoplasmic reticulum-localized molecular chaperone Cosmc. *J Cell Biol* 182: 531-542.
64. Xia L, Ju T, Westmuckett A, An G, Ivanciu L, et al. (2004) Defective angiogenesis and fatal embryonic hemorrhage in mice lacking core 1-derived O-glycans. *J Cell Biol* 164: 451-459.
65. Wang Y, Ju T, Ding X, Xia B, Wang W, et al. (2010) Cosmc is an essential chaperone for correct protein O-glycosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 9228-9233.
66. Berger EG (1999) Tn-syndrome. *Biochim Biophys Acta* 1455: 255-268.
67. Byrd JC, Bresalier RS (2004) Mucins and mucin binding proteins in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev* 23: 77-99.
68. Springer GF (1997) Immunoreactive T and Tn epitopes in cancer diagnosis, prognosis, and immunotherapy. *J Mol Med* 75: 594-602.
69. Babino A, Oppezzo P, Bianco S, Barrios E, Berois N, et al. (2000) Tn antigen is a pre-cancerous biomarker in breast tissue and serum in n-nitrosomethylurea-induced rat mammary carcinogenesis. *Int J Cancer* 86: 753-759.
70. Marcos NT, Pinho S, Grandela C, Cruz A, Samyn-Petit B, et al. (2004) Role of the human ST6GalNAc-I and ST6GalNAc-II in the synthesis of the cancer-associated sialyl-Tn antigen. *Cancer Res* 64: 7050-7057.
71. Sewell R, Backstrom M, Dalziel M, Gschmeissner S, Karlsson H, et al. (2006) The ST6GalNAc-I sialyltransferase localizes throughout the Golgi and is responsible for the synthesis of the tumor-associated sialyl-Tn O-glycan in human breast cancer. *J Biol Chem* 281: 3586-3594.
72. Julien S, Adriaenssens E, Ottenberg K, Furlan A, Courtand G, et al. (2006) ST6GalNAc I expression in MDA-MB-231 breast cancer cells greatly modifies their O-glycosylation pattern and enhances their tumorigenicity. *Glycobiology* 16: 54-64.
73. Van Elssen CH, Frings PW, Bot FJ, Van de Vijver KK, Huls MB, et al. (2010) Expression of aberrantly glycosylated Mucin-1 in ovarian cancer. *Histopathology* 57: 597-606.
74. Vazquez-Martin C, Cuevas E, Gil-Martin E, Fernandez-Briera A (2004) Correlation analysis between tumor-associated antigen sialyl-Tn expression and ST6GalNAc I activity in human colon adenocarcinoma. *Oncology* 67: 159-165.
75. Vazquez-Martin C, Gil-Martin E, Fernandez-Briera A (2005) Elevation of ST6Gal I activity in malignant and transitional tissue in human colorectal cancer. *Oncology* 69: 436-444.
76. Cazet A, Julien S, Bobowski M, Krzewinski-Recchi MA, Harduin-Lepers A, et al. (2010) Consequences of the expression of sialylated antigens in breast cancer. *Carbohydr Res* 345: 1377-1383.



77. Conze T, Carvalho AS, Landegren U, Almeida R, Reis CA, et al. (2010) MUC2 mucin is a major carrier of the cancer-associated sialyl-Tn antigen in intestinal metaplasia and gastric carcinomas. *Glycobiology* 20: 199-206.
78. Pinho S, Marcos NT, Ferreira B, Carvalho AS, Oliveira MJ, et al. (2007) Biological significance of cancer-associated sialyl-Tn antigen: modulation of malignant phenotype in gastric carcinoma cells. *Cancer Lett* 249: 157-170.
79. Julien S, Lagadec C, Krzewinski-Recchi MA, Courtand G, Le Bourhis X, et al. (2005) Stable expression of sialyl-Tn antigen in T47-D cells induces a decrease of cell adhesion and an increase of cell migration. *Breast Cancer Res Treat* 90: 77-84.
80. Kumamoto K, Goto Y, Sekikawa K, Takenoshita S, Ishida N, et al. (2001) Increased expression of UDP-galactose transporter messenger RNA in human colon cancer tissues and its implication in synthesis of Thomsen-Friedenreich antigen and sialyl Lewis A/X determinants. *Cancer Res* 61: 4620-4627.
81. Santos-Silva F, Fonseca A, Caffrey T, Carvalho F, Mesquita P, et al. (2005) Thomsen-Friedenreich antigen expression in gastric carcinomas is associated with MUC1 mucin VNTR polymorphism. *Glycobiology* 15: 511-517.
82. Van Elssen CH, Clausen H, Germeraad WT, Bennet EP, Menheere PP, et al. (2011) Flow cytometry-based assay to evaluate human serum MUC1-Tn antibodies. *J Immunol Methods* 365: 87-94.
83. O'Boyle KP, Coatsworth S, Anthony G, Ramirez M, Greenwald E, et al. (2006) Effects of desialylation of ovine submaxillary gland mucin (OSM) on humoral and cellular immune responses to Tn and sialylated Tn. *Cancer Immun* 6: 5.
84. Xu Y, Sette A, Sidney J, Gendler SJ, Franco A (2005) Tumor-associated carbohydrate antigens: a possible avenue for cancer prevention. *Immunol Cell Biol* 83: 440-448.
85. Hakomori S (2001) Tumor-associated carbohydrate antigens defining tumor malignancy: basis for development of anti-cancer vaccines. *Adv Exp Med Biol* 491: 369-402.
86. Lloyd KO (2000) Carbohydrate vaccines for the immunotherapy of cancer. *Drug News Perspect* 13: 463-470.
87. Napolitano C, Rughetti A, Agervig Tarp MP, Coleman J, Bennett EP, et al. (2007) Tumor-associated Tn-MUC1 glycoform is internalized through the macrophage galactose-type C-type lectin and delivered to the HLA class I and II compartments in dendritic cells. *Cancer Res* 67: 8358-8367.
88. Saeland E, van Kooyk Y (2011) Highly glycosylated tumour antigens: interactions with the immune system. *Biochem Soc Trans* 39: 388-392.
89. Saeland E, van Vliet SJ, Backstrom M, van den Berg VC, Geijtenbeek TB, et al. (2007) The C-type lectin MGL expressed by dendritic cells detects glycan changes on MUC1 in colon carcinoma. *Cancer Immunol Immunother* 56: 1225-1236.
90. Li Q, Anver MR, Butcher DO, Gildersleeve JC (2009) Resolving conflicting data on expression of the Tn antigen and implications for clinical trials with cancer vaccines. *Mol Cancer Ther* 8: 971-979.
91. Holmberg LA, Sandmaier BM (2004) Vaccination with Theratope (STn-KLH) as treatment for breast cancer. *Expert Rev Vaccines* 3: 655-663.
92. Ltd AI (2003) Cancer vaccine THERATOPE- Biomira. *Drugs R D* 4: 236-240.
93. Julien S, Picco G, Sewell R, Vercoutter-Edouart AS, Tarp M, et al. (2009) Sialyl-Tn vaccine induces antibody-mediated tumour protection in a relevant murine model. *Br J Cancer* 100: 1746-1754.
94. Gilewski TA, Ragupathi G, Dickler M, Powell S, Bhuta S, et al. (2007) Immunization of high-risk breast cancer patients with clustered sTn-KLH conjugate plus the immunologic adjuvant QS-21. *Clin Cancer Res* 13: 2977-2985.

95. Slovin SF, Ragupathi G, Musselli C, Fernandez C, Diani M, et al. (2005) Thomsen-Friedenreich (TF) antigen as a target for prostate cancer vaccine: clinical trial results with TF cluster (c)-KLH plus QS21 conjugate vaccine in patients with biochemically relapsed prostate cancer. *Cancer Immunol Immunother* 54: 694-702.
96. Xu Y, Gendler SJ, Franco A (2004) Designer glycopeptides for cytotoxic T cell-based elimination of carcinomas. *J Exp Med* 199: 707-716.
97. Sharon N, Lis H (2004) History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology* 14: 53R-62R.
98. Lefrere JJ, Berche P (2010) [Karl Landsteiner discovers the blood groups]. *Transfus Clin Biol* 17: 1-8.
99. O M (1957) Studies in hemagglutinins of leguminosae seeds. *Ann Med Exp Biol Fenn* 35: 1-133.
100. Boyd WC, Shapleigh E (1954) Specific Precipitating Activity of Plant Agglutinins (Lectins). *Science* 119: 419.
101. Nowell PC (1960) Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. *Cancer Res* 20: 462-466.
102. Powell AE, Leon MA (1970) Reversible interaction of human lymphocytes with the mitogen concanavalin A. *Exp Cell Res* 62: 315-325.
103. Morgan DA, Ruscetti FW, Gallo R (1976) Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science* 193: 1007-1008.
104. Aub JC, Sanford BH, Wang LH (1965) Reactions of normal and leukemic cell surfaces to a wheat germ agglutinin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 54: 400-402.
105. Van Damme EJ, Peumans WJ, Barre A, Rougé P (1998) Plant lectins: A composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. *Critical Reviews in Plant Sciences* 17: 575-692.
106. Peumans WJ, Van Damme EJ (1998) Plant lectins: specific tools for the identification, isolation, and characterization of O-linked glycans. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 33: 209-258.
107. Sharon N (2008) Lectins: past, present and future. *Biochem Soc Trans* 36: 1457-1460.
108. Jain D, Kaur KJ, Salunke DM (2001) Plasticity in protein-peptide recognition: crystal structures of two different peptides bound to concanavalin A. *Biophys J* 80: 2912-2921.
109. Jeyaprakash AA, Katiyar S, Swaminathan CP, Sekar K, Surolia A, et al. (2003) Structural basis of the carbohydrate specificities of jacalin: an X-ray and modeling study. *J Mol Biol* 332: 217-228.
110. Dam TK, Gerken TA, Cavada BS, Nascimento KS, Moura TR, et al. (2007) Binding studies of alpha-GalNAc-specific lectins to the alpha-GalNAc (Tn-antigen) form of porcine submaxillary mucin and its smaller fragments. *J Biol Chem* 282: 28256-28263.
111. Peumans WJ, van Damme EJ (1995) The role of lectins in plant defence. *Histochem J* 27: 253-271.
112. Zhou Y, Tian Y, Wu B, Mang K (1998) Inhibition effect of transgenic tobacco plants expressing snowdrop lectin on the population development of *Myzus persicae*. *Chin J Biotechnol* 14: 9-16.
113. Rao KV, Rathore KS, Hodges TK, Fu X, Stoger E, et al. (1998) Expression of snowdrop lectin (GNA) in transgenic rice plants confers resistance to rice brown planthopper. *Plant J* 15: 469-477.
114. Babosha AV (2008) Inducible lectins and plant resistance to pathogens and abiotic stress. *Biochemistry (Mosc)* 73: 812-825.

115. Van Damme EJ, Lannoo N, Fouquaert E, Peumans WJ (2004) The identification of inducible cytoplasmic/nuclear carbohydrate-binding proteins urges to develop novel concepts about the role of plant lectins. *Glycoconj J* 20: 449-460.
116. Schouppe D, Ghesquiere B, Menschaert G, De Vos W, Bourque S, et al. (2011) Interaction of the tobacco lectin with histone proteins. *Plant Physiol*.
117. Liu B, Bian HJ, Bao JK (2010) Plant lectins: potential antineoplastic drugs from bench to clinic. *Cancer Lett* 287: 1-12.
118. De Mejia EG, Prisecaru VI (2005) Lectins as bioactive plant proteins: a potential in cancer treatment. *Crit Rev Food Sci Nutr* 45: 425-445.
119. Block G, Patterson B, Subar A (1992) Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. *Nutr Cancer* 18: 1-29.
120. Wimer BM (1996) Putative effects of mitogenic lectin therapy corroborated by alloactivation data. *Cancer Biother Radiopharm* 11: 57-75.
121. Rabinovich GA, Liu FT, Hirashima M, Anderson A (2007) An emerging role for galectins in tuning the immune response: lessons from experimental models of inflammatory disease, autoimmunity and cancer. *Scand J Immunol* 66: 143-158.
122. Lei HY, Chang CP (2009) Lectin of Concanavalin A as an anti-hepatoma therapeutic agent. *J Biomed Sci* 16: 10.
123. Beuth J (1997) Clinical relevance of immunoactive mistletoe lectin-I. *Anticancer Drugs* 8 Suppl 1: S53-55.
124. Matthes H, Friedel WE, Bock PR, Zanker KS (2010) Molecular mistletoe therapy: friend or foe in established anti-tumor protocols? A multicenter, controlled, retrospective pharmaco-epidemiological study in pancreas cancer. *Curr Mol Med* 10: 430-439.
125. Holtskog R, Sandvig K, Olsnes S (1988) Characterization of a toxic lectin in Iscador, a mistletoe preparation with alleged cancerostatic properties. *Oncology* 45: 172-179.
126. Thies A, Dautel P, Meyer A, Pfuller U, Schumacher U (2008) Low-dose mistletoe lectin-I reduces melanoma growth and spread in a scid mouse xenograft model. *Br J Cancer* 98: 106-112.
127. Ryder SD, Jacyna MR, Levi AJ, Rizzi PM, Rhodes JM (1998) Peanut ingestion increases rectal proliferation in individuals with mucosal expression of peanut lectin receptor. *Gastroenterology* 114: 44-49.
128. Woodley JF (2000) Lectins for gastrointestinal targeting--15 years on. *J Drug Target* 7: 325-333.
129. Wang Q, Yu LG, Campbell BJ, Milton JD, Rhodes JM (1998) Identification of intact peanut lectin in peripheral venous blood. *Lancet* 352: 1831-1832.
130. Li CY, Xu HL, Liu B, Bao JK (2010) Concanavalin A, from an old protein to novel candidate anti-neoplastic drug. *Curr Mol Pharmacol* 3: 123-128.
131. Liu B, Min MW, Bao JK (2009) Induction of apoptosis by Concanavalin A and its molecular mechanisms in cancer cells. *Autophagy* 5: 432-433.
132. Liu B, Li CY, Bian HJ, Min MW, Chen LF, et al. (2009) Antiproliferative activity and apoptosis-inducing mechanism of Concanavalin A on human melanoma A375 cells. *Arch Biochem Biophys* 482: 1-6.
133. Amin AR, Paul RK, Thakur VS, Agarwal ML (2007) A novel role for p73 in the regulation of Akt-Foxo1a-Bim signaling and apoptosis induced by the plant lectin, Concanavalin A. *Cancer Res* 67: 5617-5621.
134. Amin AR, Thakur VS, Gupta K, Jackson MW, Harada H, et al. (2010) Restoration of p53 functions protects cells from concanavalin A-induced apoptosis. *Mol Cancer Ther* 9: 471-479.

135. Biswas MH, Hasegawa HH, Rahman MA, Huang P, Mon NN, et al. (2006) SHP-2-Erk signaling regulates concanavalin A-dependent production of TIMP-2. *Biochem Biophys Res Commun* 348: 1145-1149.
136. Lei HY, Chang CP (2007) Induction of autophagy by concanavalin A and its application in anti-tumor therapy. *Autophagy* 3: 402-404.
137. Chang CP, Yang MC, Liu HS, Lin YS, Lei HY (2007) Concanavalin A induces autophagy in hepatoma cells and has a therapeutic effect in a murine in situ hepatoma model. *Hepatology* 45: 286-296.
138. Miyagi T, Takehara T, Tatsumi T, Suzuki T, Jinushi M, et al. (2004) Concanavalin A injection activates intrahepatic innate immune cells to provoke an antitumor effect in murine liver. *Hepatology* 40: 1190-1196.
139. Huang W, Dong Z, Wei H, Ding C, Sun R, et al. (2006) Selective elimination of hepatic natural killer T cells with concanavalin A improves liver regeneration in mice. *Liver Int* 26: 339-345.
140. Lorea P, Goldschmidt D, Darro F, Salmon I, Bovin N, et al. (1997) In vitro characterization of lectin-induced alterations on the proliferative activity of three human melanoma cell lines. *Melanoma Res* 7: 353-363.
141. Pryme IF, Bardocz S, Pusztai A, Ewen SW (1999) The growth of an established murine non-Hodgkin lymphoma tumour is limited by switching to a phytohaemagglutinin-containing diet. *Cancer Lett* 146: 87-91.
142. Pryme IF, Pusztai AJ, Grant G, Bardocz S (1996) The effect of switching between a phytohemagglutinin-containing and a control diet on the growth and lipid content of a Krebs II lymphosarcoma tumor. *J Exp Ther Oncol* 1: 273-277.
143. Bardocz S, Grant G, Duguid TJ, Brown DS, Pusztai A, et al. (1997) Intracellular levels of polyamines in Krebs II lymphosarcoma cells in mice fed phytohaemagglutinin-containing diets are coupled with altered tumour growth. *Cancer Lett* 121: 25-29.
144. Cochran AJ, Wen DR, Berthier-Vergnes O, Bailly C, Dore JF, et al. (1999) Cytoplasmic accumulation of peanut agglutinin-binding glycoconjugates in the cells of primary melanoma correlates with clinical outcome. *Hum Pathol* 30: 556-561.
145. Dore JF, Maisonneuve P, Cattaruzza MS, Autier P, Cochran AJ, et al. (1997) A molecular epidemiological approach to the study of expression of a metastasis marker in primary melanomas and its correlation with individual patient's risk of recurrence or metastasis. *Melanoma Res* 7 Suppl 2: S121-125.
146. Sakuma S, Yano T, Masaoka Y, Kataoka M, Hiwatari K, et al. (2010) Detection of early colorectal cancer imaged with peanut agglutinin-immobilized fluorescent nanospheres having surface poly(N-vinylacetamide) chains. *Eur J Pharm Biopharm* 74: 451-460.
147. Sakuma S, Yano T, Masaoka Y, Kataoka M, Hiwatari K, et al. (2009) In vitro/in vivo biorecognition of lectin-immobilized fluorescent nanospheres for human colorectal cancer cells. *J Control Release* 134: 2-10.
148. Hartley MR, Lord JM (2004) Cytotoxic ribosome-inactivating lectins from plants. *Biochim Biophys Acta* 1701: 1-14.
149. Hu R, Zhai Q, Liu W, Liu X (2001) An insight into the mechanism of cytotoxicity of ricin to hepatoma cell: roles of Bcl-2 family proteins, caspases, Ca(2+)-dependent proteases and protein kinase C. *J Cell Biochem* 81: 583-593.
150. Mengs U, Gothel D, Leng-Peschlow E (2002) Mistletoe extracts standardized to mistletoe lectins in oncology: review on current status of preclinical research. *Anticancer Res* 22: 1399-1407.
151. Beuth J, Ko HL, Schneider H, Tawadros S, Kasper HU, et al. (2006) Intratumoral application of standardized mistletoe extracts down regulates tumor weight via

- decreased cell proliferation, increased apoptosis and necrosis in a murine model. *Anticancer Res* 26: 4451-4456.
152. Sabova L, Pilatova M, Szilagyi K, Sabo R, Mojzis J (2010) Cytotoxic effect of mistletoe (*Viscum album* L.) extract on Jurkat cells and its interaction with doxorubicin. *Phytother Res* 24: 365-368.
  153. Seifert G, Jesse P, Laengler A, Reindl T, Luth M, et al. (2008) Molecular mechanisms of mistletoe plant extract-induced apoptosis in acute lymphoblastic leukemia in vivo and in vitro. *Cancer Lett* 264: 218-228.
  154. Lavastre V, Chiasson S, Cavalli H, Girard D (2005) *Viscum album* agglutinin-I (VAA-I) induces apoptosis and degradation of cytoskeletal proteins in human leukemia PLB-985 and X-CGD cells via caspases: lamin B1 is a novel target of VAA-I. *Leuk Res* 29: 1443-1453.
  155. Harmsma M, Gromme M, Ummelen M, Dignef W, Tusenius KJ, et al. (2004) Differential effects of *Viscum album* extract IscadorQu on cell cycle progression and apoptosis in cancer cells. *Int J Oncol* 25: 1521-1529.
  156. Kim WH, Park WB, Gao B, Jung MH (2004) Critical role of reactive oxygen species and mitochondrial membrane potential in Korean mistletoe lectin-induced apoptosis in human hepatocarcinoma cells. *Mol Pharmacol* 66: 1383-1396.
  157. Schumacher U, Feldhaus S, Mengs U (2000) Recombinant mistletoe lectin (rML) is successful in treating human ovarian cancer cells transplanted into severe combined immunodeficient (SCID) mice. *Cancer Lett* 150: 171-175.
  158. Ohba H, Bakalova R, Muraki M (2003) Cytoagglutination and cytotoxicity of Wheat Germ Agglutinin isolectins against normal lymphocytes and cultured leukemic cell lines--relationship between structure and biological activity. *Biochim Biophys Acta* 1619: 144-150.
  159. Zalatnai A, Lapis K, Szende B, Raso E, Telekes A, et al. (2001) Wheat germ extract inhibits experimental colon carcinogenesis in F-344 rats. *Carcinogenesis* 22: 1649-1652.
  160. Liu WK, Sze SC, Ho JC, Liu BP, Yu MC (2004) Wheat germ lectin induces G2/M arrest in mouse L929 fibroblasts. *J Cell Biochem* 91: 1159-1173.
  161. Gastman B, Wang K, Han J, Zhu ZY, Huang X, et al. (2004) A novel apoptotic pathway as defined by lectin cellular initiation. *Biochem Biophys Res Commun* 316: 263-271.
  162. Bausch JN, Poretz RD (1977) Purification and properties of the hemagglutinin from *Maclura pomifera* seeds. *Biochemistry* 16: 5790-5794.
  163. Soares MB, Armada JL, Soares VM, Seuanez HN (1982) *Artocarpus integrifolia* lectin(s): use and applications in chromosome studies of lymphocyte cultures. *Cytobios* 34: 165-174.
  164. Young NM, Johnston RA, Watson DC (1991) The amino acid sequences of jacalin and the *Maclura pomifera* agglutinin. *FEBS Lett* 282: 382-384.
  165. Mahanta SK, Sastry MV, Surolia A (1990) Topography of the combining region of a Thomsen-Friedenreich-antigen-specific lectin jacalin (*Artocarpus integrifolia* agglutinin). A thermodynamic and circular-dichroism spectroscopic study. *Biochem J* 265: 831-840.
  166. Tachibana K, Nakamura S, Wang H, Iwasaki H, Tachibana K, et al. (2006) Elucidation of binding specificity of Jacalin toward O-glycosylated peptides: quantitative analysis by frontal affinity chromatography. *Glycobiology* 16: 46-53.
  167. Roque-Barreira MC, Praz F, Halbwachs-Mecarelli L, Greene LJ, Campos-Neto A (1986) IgA-affinity purification and characterization of the lectin jacalin. *Braz J Med Biol Res* 19: 149-157.

168. Corbeau P, Pasquali JL, Devaux C (1995) Jacalin, a lectin interacting with O-linked sugars and mediating protection of CD4<sup>+</sup> cells against HIV-1, binds to the external envelope glycoprotein gp120. *Immunol Lett* 47: 141-143.
169. Raval S, Gowda SB, Singh DD, Chandra NR (2004) A database analysis of jacalin-like lectins: sequence-structure-function relationships. *Glycobiology* 14: 1247-1263.
170. Yang H, Czapla TH (1993) Isolation and characterization of cDNA clones encoding jacalin isolectins. *J Biol Chem* 268: 5905-5910.
171. Young NM, Watson DC, Thibault P (1995) Mass spectrometric analysis of genetic and post-translational heterogeneity in the lectins Jacalin and Maclura pomifera agglutinin. *Glycoconj J* 12: 135-141.
172. Sankaranarayanan R, Sekar K, Banerjee R, Sharma V, Surolia A, et al. (1996) A novel mode of carbohydrate recognition in jacalin, a Moraceae plant lectin with a beta-prism fold. *Nat Struct Biol* 3: 596-603.
173. Baba M, Yong Ma B, Nonaka M, Matsuishi Y, Hirano M, et al. (2007) Glycosylation-dependent interaction of Jacalin with CD45 induces T lymphocyte activation and Th1/Th2 cytokine secretion. *J Leukoc Biol* 81: 1002-1011.
174. Ma BY, Yoshida K, Baba M, Nonaka M, Matsumoto S, et al. (2009) The lectin Jacalin induces human B-lymphocyte apoptosis through glycosylation-dependent interaction with CD45. *Immunology* 127: 477-488.
175. Ahmed N, Pany S, Rahman A, Srivastava SS, Sneha A, et al. (2010) Modulation of PP2A activity by Jacalin: is it through caveolae and ER chaperones? *Glycoconj J* 27: 723-734.
176. Van Damme EJ, Hause B, Hu J, Barre A, Rouge P, et al. (2002) Two distinct jacalin-related lectins with a different specificity and subcellular location are major vegetative storage proteins in the bark of the black mulberry tree. *Plant Physiol* 130: 757-769.
177. Singh T, Wu JH, Peumans WJ, Rouge P, Van Damme EJ, et al. (2007) Recognition profile of *Morus nigra* agglutinin (Morniga G) expressed by monomeric ligands, simple clusters and mammalian polyvalent glycotopes. *Mol Immunol* 44: 451-462.
178. Rhodes JM, Campbell BJ, Yu LG (2008) Lectin-epithelial interactions in the human colon. *Biochem Soc Trans* 36: 1482-1486.
179. Kasuya T, Jung J, Kadoya H, Matsuzaki T, Tatematsu K, et al. (2008) In vivo delivery of bionanocapsules displaying *Phaseolus vulgaris* agglutinin-L4 isolectin to malignant tumors overexpressing N-acetylglucosaminyltransferase V. *Hum Gene Ther* 19: 887-895.
180. Du J, Lu WL, Ying X, Liu Y, Du P, et al. (2009) Dual-targeting topotecan liposomes modified with tamoxifen and wheat germ agglutinin significantly improve drug transport across the blood-brain barrier and survival of brain tumor-bearing animals. *Mol Pharm* 6: 905-917.
181. Schoffski P, Riggert S, Fumoleau P, Campone M, Bolte O, et al. (2004) Phase I trial of intravenous aviscumine (rViscumin) in patients with solid tumors: a study of the European Organization for Research and Treatment of Cancer New Drug Development Group. *Ann Oncol* 15: 1816-1824.
182. Bernier J, Hall EJ, Giaccia A (2004) Radiation oncology: a century of achievements. *Nat Rev Cancer* 4: 737-747.
183. Chabner BA, Roberts TG, Jr. (2005) Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. *Nat Rev Cancer* 5: 65-72.
184. Bertelli G, Paridaens R (2006) Optimal sequence of hormonotherapy in advanced breast cancer. *Curr Opin Oncol* 18: 572-577.
185. Mellstedt H (2003) Monoclonal antibodies in human cancer. *Drugs Today (Barc)* 39 Suppl C: 1-16.

186. Johnstone RW, Frew AJ, Smyth MJ (2008) The TRAIL apoptotic pathway in cancer onset, progression and therapy. *Nat Rev Cancer* 8: 782-798.
187. Herbst RS, Eckhardt SG, Kurzrock R, Ebbinghaus S, O'Dwyer PJ, et al. (2010) Phase I dose-escalation study of recombinant human Apo2L/TRAIL, a dual proapoptotic receptor agonist, in patients with advanced cancer. *J Clin Oncol* 28: 2839-2846.
188. Dolmans DE, Fukumura D, Jain RK (2003) Photodynamic therapy for cancer. *Nat Rev Cancer* 3: 380-387.
189. Allison RR, Bagnato VS, Cuenca R, Downie GH, Sibata CH (2006) The future of photodynamic therapy in oncology. *Future Oncol* 2: 53-71.
190. Knobler R, Barr ML, Couriel DR, Ferrara JL, French LE, et al. (2009) Extracorporeal photopheresis: past, present, and future. *J Am Acad Dermatol* 61: 652-665.
191. Miller JD, Kirkland EB, Domingo DS, Scull H, Jekutis B, et al. (2007) Review of extracorporeal photopheresis in early-stage (IA, IB, and IIA) cutaneous T-cell lymphoma. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 23: 163-171.
192. Knobler R, Girardi M (2001) Extracorporeal photochemoimmunotherapy in cutaneous T cell lymphomas. *Ann N Y Acad Sci* 941: 123-138.
193. Geskin L (2007) ECP versus PUVA for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma. *Skin Therapy Lett* 12: 1-4.
194. Chiesa-Fuxench ZC, Gonzalez-Chavez J (2010) Extracorporeal photopheresis: a review on the immunological aspects and clinical applications. *P R Health Sci J* 29: 337-347.
195. Ackroyd R, Kelty C, Brown N, Reed M (2001) The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* 74: 656-669.
196. Finsen N (1901) *Phototherapy*. Arnold : London.
197. Raab O (1900) On the effect of fluorescent substances on infusoria. *Z Biol* 39: 524-546.
198. Trappeiner HV JA (1907) The sensitizing action of fluorescent substances ; An overall account of investigations on photodynamic phenomena. FCW Vogel, Leipzig.
199. Trappeiner HJ, A (1903) Therapeutic experiments with fluorescent substances. *Med Wochenschr* 47: 2042-2044.
200. Kim KH, Park JJ (2010) The Effects of Photodynamic Therapy in Upper-Gastrointestinal Malignant Diseases. *Gut Liver* 4: S39-S43.
201. Moghissi K, Dixon K, Stringer M, Thorpe JA (2009) Photofrin PDT for early stage oesophageal cancer: long term results in 40 patients and literature review. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 6: 159-166.
202. Bown SG, Rogowska AZ, Whitelaw DE, Lees WR, Lovat LB, et al. (2002) Photodynamic therapy for cancer of the pancreas. *Gut* 50: 549-557.
203. Plumas J, Drillat P, Jacob MC, Richard MJ, Favrot MC (2003) [Extracorporeal photochemotherapy for treatment of clonal T cell proliferations]. *Bull Cancer* 90: 763-770.
204. Edelson R, Berger C, Gasparro F, Jegasothy B, Heald P, et al. (1987) Treatment of cutaneous T-cell lymphoma by extracorporeal photochemotherapy. Preliminary results. *N Engl J Med* 316: 297-303.
205. Oliven A, Shechter Y (2001) Extracorporeal photopheresis: a review. *Blood Rev* 15: 103-108.
206. Maeda A (2009) Extracorporeal photochemotherapy. *J Dermatol Sci* 54: 150-156.
207. Bladon J, Taylor PC (1999) Extracorporeal photopheresis induces apoptosis in the lymphocytes of cutaneous T-cell lymphoma and graft-versus-host disease patients. *Br J Haematol* 107: 707-711.
208. Bladon J, Taylor PC (2006) Extracorporeal photopheresis: a focus on apoptosis and cytokines. *J Dermatol Sci* 43: 85-94.

209. Hannani D, Merlin E, Gabert F, Laurin D, Demeocq F, et al. (2010) Photochemotherapy induces a faster apoptosis of alloreactive activated T cells than of nonalloreactive resting T cells in graft versus host disease. *Transplantation* 90: 1232-1238.
210. Hannani D, Gabert F, Chaperot L, Richard MJ, Plumas J (2010) [Extracorporeal photochemotherapy or immunotherapy using cells modified by photochemistry]. *Rev Med Interne* 31: 321-324.
211. Aubin F, Puzenat E, Arveux P, Louvat P, Quencez E, et al. (2001) Genital squamous cell carcinoma in men treated by photochemotherapy. A cancer registry-based study from 1978 to 1998. *Br J Dermatol* 144: 1204-1206.
212. Barr ML (1998) Photopheresis in transplantation: future research and directions. *Transplant Proc* 30: 2248-2250.
213. Nyman ES, Hynninen PH (2004) Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B* 73: 1-28.
214. Pass HI (1993) Photodynamic therapy in oncology: mechanisms and clinical use. *J Natl Cancer Inst* 85: 443-456.
215. Ngen EJ, Daniels TS, Murthy RS, Detty MR, You Y (2008) Core-modified porphyrins. Part 6: Effects of lipophilicity and core structures on physicochemical and biological properties in vitro. *Bioorg Med Chem* 16: 3171-3183.
216. O'Connor AE, Gallagher WM, Byrne AT (2009) Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: preclinical and clinical advances in photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* 85: 1053-1074.
217. Lipson RL, Baldes EJ, Olsen AM (1961) The use of a derivative of hematoporphyrin in tumor detection. *J Natl Cancer Inst* 26: 1-11.
218. Dougherty TJ, Kaufman JE, Goldfarb A, Weishaupt KR, Boyle D, et al. (1978) Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. *Cancer Res* 38: 2628-2635.
219. Mitra S, Foster TH (2005) Photophysical parameters, photosensitizer retention and tissue optical properties completely account for the higher photodynamic efficacy of meso-tetra-hydroxyphenyl-chlorin vs Photofrin. *Photochem Photobiol* 81: 849-859.
220. Chen Q, Huang Z, Luck D, Beckers J, Brun PH, et al. (2002) Preclinical studies in normal canine prostate of a novel palladium-bacteriopheophorbide (WST09) photosensitizer for photodynamic therapy of prostate cancers. *Photochem Photobiol* 76: 438-445.
221. Koudinova NV, Pinthus JH, Brandis A, Brenner O, Bendel P, et al. (2003) Photodynamic therapy with Pd-Bacteriopheophorbide (TOOKAD): successful in vivo treatment of human prostatic small cell carcinoma xenografts. *Int J Cancer* 104: 782-789.
222. Trachtenberg J, Bogaards A, Weersink RA, Haider MA, Evans A, et al. (2007) Vascular targeted photodynamic therapy with palladium-bacteriopheophorbide photosensitizer for recurrent prostate cancer following definitive radiation therapy: assessment of safety and treatment response. *J Urol* 178: 1974-1979; discussion 1979.
223. Moor AC (2000) Signaling pathways in cell death and survival after photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B* 57: 1-13.
224. Dewaele M, Verfaillie T, Martinet W, Agostinis P (2010) Death and survival signals in photodynamic therapy. *Methods Mol Biol* 635: 7-33.
225. Buytaert E, Dewaele M, Agostinis P (2007) Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochim Biophys Acta* 1776: 86-107.
226. Wyld L, Reed MW, Brown NJ (2001) Differential cell death response to photodynamic therapy is dependent on dose and cell type. *Br J Cancer* 84: 1384-1386.



227. Rancan F, Wiehe A, Nobel M, Senge MO, Omari SA, et al. (2005) Influence of substitutions on asymmetric dihydroxychlorins with regard to intracellular uptake, subcellular localization and photosensitization of Jurkat cells. *J Photochem Photobiol B* 78: 17-28.
228. Almeida RD, Manadas BJ, Carvalho AP, Duarte CB (2004) Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy. *Biochim Biophys Acta* 1704: 59-86.
229. Machado AH, Pacheco Soares C, da Silva NS, Moraes KC (2009) Cellular and molecular studies of the initial process of the photodynamic therapy in HEp-2 cells using LED light source and two different photosensitizers. *Cell Biol Int* 33: 785-795.
230. Hatz S, Lambert JD, Ogilby PR (2007) Measuring the lifetime of singlet oxygen in a single cell: addressing the issue of cell viability. *Photochem Photobiol Sci* 6: 1106-1116.
231. Olivo M, Ali-Seyed M (2007) Apoptosis signalling mechanisms in human cancer cells induced by Calphostin-PDT. *Int J Oncol* 30: 537-548.
232. Castano AP, Mroz P, Hamblin MR (2006) Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nat Rev Cancer* 6: 535-545.
233. Korbek M (1996) Induction of tumor immunity by photodynamic therapy. *J Clin Laser Med Surg* 14: 329-334.
234. Kros G, Korbek M, Dougherty GJ (1995) Induction of immune cell infiltration into murine SCCVII tumour by photofrin-based photodynamic therapy. *Br J Cancer* 71: 549-555.
235. Agostinis P, Buytaert E, Breysens H, Hendrickx N (2004) Regulatory pathways in photodynamic therapy induced apoptosis. *Photochem Photobiol Sci* 3: 721-729.
236. Karioti A, Bilia AR (2010) Hypericins as potential leads for new therapeutics. *Int J Mol Sci* 11: 562-594.
237. Ahmad N, Gupta S, Feyes DK, Mukhtar H (2000) Involvement of Fas (APO-1/CD-95) during photodynamic-therapy-mediated apoptosis in human epidermoid carcinoma A431 cells. *J Invest Dermatol* 115: 1041-1046.
238. Ali SM, Chee SK, Yuen GY, Olivo M (2002) Hypericin induced death receptor-mediated apoptosis in photoactivated tumor cells. *Int J Mol Med* 9: 601-616.
239. Yokota T, Ikeda H, Inokuchi T, Sano K, Koji T (2000) Enhanced cell death in NR-S1 tumor by photodynamic therapy: possible involvement of Fas and Fas ligand system. *Lasers Surg Med* 26: 449-460.
240. Chen B, Roskams T, Xu Y, Agostinis P, de Witte PA (2002) Photodynamic therapy with hypericin induces vascular damage and apoptosis in the RIF-1 mouse tumor model. *Int J Cancer* 98: 284-290.
241. Li B, Chu X, Gao M, Li W (2010) Apoptotic mechanism of MCF-7 breast cells in vivo and in vitro induced by photodynamic therapy with C-phycoerythrin. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 42: 80-89.
242. Schempp CM, Simon-Haarhaus B, Termeer CC, Simon JC (2001) Hypericin photo-induced apoptosis involves the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and activation of caspase-8. *FEBS Lett* 493: 26-30.
243. Zhuang S, Lynch MC, Kochevar IE (1999) Caspase-8 mediates caspase-3 activation and cytochrome c release during singlet oxygen-induced apoptosis of HL-60 cells. *Exp Cell Res* 250: 203-212.
244. Liu T, Wu LY, Choi JK, Berkman CE (2010) Targeted photodynamic therapy for prostate cancer: inducing apoptosis via activation of the caspase-8/-3 cascade pathway. *Int J Oncol* 36: 777-784.
245. Rupinder SK, Gurpreet AK, Manjeet S (2007) Cell suicide and caspases. *Vascul Pharmacol* 46: 383-393.

246. Kessel D, Luo Y (1999) Photodynamic therapy: a mitochondrial inducer of apoptosis. *Cell Death Differ* 6: 28-35.
247. Chiu SM, Xue LY, Azizuddin K, Oleinick NL (2005) Photodynamic therapy-induced death of HCT 116 cells: Apoptosis with or without Bax expression. *Apoptosis* 10: 1357-1368.
248. Miller JD, Baron ED, Scull H, Hsia A, Berlin JC, et al. (2007) Photodynamic therapy with the phthalocyanine photosensitizer Pc 4: the case experience with preclinical mechanistic and early clinical-translational studies. *Toxicol Appl Pharmacol* 224: 290-299.
249. Srivastava M, Ahmad N, Gupta S, Mukhtar H (2001) Involvement of Bcl-2 and Bax in photodynamic therapy-mediated apoptosis. Antisense Bcl-2 oligonucleotide sensitizes RIF 1 cells to photodynamic therapy apoptosis. *J Biol Chem* 276: 15481-15488.
250. Chiu SM, Xue LY, Usuda J, Azizuddin K, Oleinick NL (2003) Bax is essential for mitochondrion-mediated apoptosis but not for cell death caused by photodynamic therapy. *Br J Cancer* 89: 1590-1597.
251. Separovic D, Mann KJ, Oleinick NL (1998) Association of ceramide accumulation with photodynamic treatment-induced cell death. *Photochem Photobiol* 68: 101-109.
252. Separovic D, Bielawski J, Pierce JS, Merchant S, Tarca AL, et al. (2009) Increased tumour dihydroceramide production after Photofrin-PDT alone and improved tumour response after the combination with the ceramide analogue LCL29. Evidence from mouse squamous cell carcinomas. *Br J Cancer* 100: 626-632.
253. Hannun YA, Obeid LM (1997) Mechanisms of ceramide-mediated apoptosis. *Adv Exp Med Biol* 407: 145-149.
254. Separovic D, Pink JJ, Oleinick NA, Kester M, Boothman DA, et al. (1999) Niemann-Pick human lymphoblasts are resistant to phthalocyanine 4-photodynamic therapy-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 258: 506-512.
255. Separovic D, Hanada K, Maitah MY, Nagy B, Hang I, et al. (2007) Sphingomyelin synthase 1 suppresses ceramide production and apoptosis post-photodamage. *Biochem Biophys Res Commun* 358: 196-202.
256. Furre IE, Shahzidi S, Luksiene Z, Moller MT, Borgen E, et al. (2005) Targeting PBR by hexaminolevulinate-mediated photodynamic therapy induces apoptosis through translocation of apoptosis-inducing factor in human leukemia cells. *Cancer Res* 65: 11051-11060.
257. Furre IE, Moller MT, Shahzidi S, Nesland JM, Peng Q (2006) Involvement of both caspase-dependent and -independent pathways in apoptotic induction by hexaminolevulinate-mediated photodynamic therapy in human lymphoma cells. *Apoptosis* 11: 2031-2042.
258. Buytaert E, Callewaert G, Hendrickx N, Scorrano L, Hartmann D, et al. (2006) Role of endoplasmic reticulum depletion and multidomain proapoptotic BAX and BAK proteins in shaping cell death after hypericin-mediated photodynamic therapy. *Faseb J* 20: 756-758.
259. Chiu SM, Xue LY, Lam M, Rodriguez ME, Zhang P, et al. (2010) A requirement for bid for induction of apoptosis by photodynamic therapy with a lysosome- but not a mitochondrion-targeted photosensitizer. *Photochem Photobiol* 86: 1161-1173.
260. Reiners JJ, Jr., Caruso JA, Mathieu P, Chelladurai B, Yin XM, et al. (2002) Release of cytochrome c and activation of pro-caspase-9 following lysosomal photodamage involves Bid cleavage. *Cell Death Differ* 9: 934-944.
261. Xue LY, Chiu SM, Azizuddin K, Joseph S, Oleinick NL (2008) Protection by Bcl-2 against apoptotic but not autophagic cell death after photodynamic therapy. *Autophagy* 4: 125-127.

262. Reiners JJ, Jr., Agostinis P, Berg K, Oleinick NL, Kessel D (2010) Assessing autophagy in the context of photodynamic therapy. *Autophagy* 6: 7-18.
263. Kessel D, Reiners JJ, Jr. (2007) Apoptosis and autophagy after mitochondrial or endoplasmic reticulum photodamage. *Photochem Photobiol* 83: 1024-1028.
264. Bladon J, Taylor PC (2002) Extracorporeal photopheresis in cutaneous T-cell lymphoma and graft-versus-host disease induces both immediate and progressive apoptotic processes. *Br J Dermatol* 146: 59-68.
265. Heshmati F (2003) Mechanisms of action of extracorporeal photochemotherapy. *Transfus Apher Sci* 29: 61-70.
266. Dolmans DE, Kadambi A, Hill JS, Waters CA, Robinson BC, et al. (2002) Vascular accumulation of a novel photosensitizer, MV6401, causes selective thrombosis in tumor vessels after photodynamic therapy. *Cancer Res* 62: 2151-2156.
267. Preise D, Oren R, Glinert I, Kalchenko V, Jung S, et al. (2009) Systemic antitumor protection by vascular-targeted photodynamic therapy involves cellular and humoral immunity. *Cancer Immunol Immunother* 58: 71-84.
268. Kabingu E, Vaughan L, Owczarczak B, Ramsey KD, Gollnick SO (2007) CD8+ T cell-mediated control of distant tumours following local photodynamic therapy is independent of CD4+ T cells and dependent on natural killer cells. *Br J Cancer* 96: 1839-1848.
269. Kabingu E, Oseroff AR, Wilding GE, Gollnick SO (2009) Enhanced systemic immune reactivity to a Basal cell carcinoma associated antigen following photodynamic therapy. *Clin Cancer Res* 15: 4460-4466.
270. Zhang H, Ma W, Li Y (2009) Generation of effective vaccines against liver cancer by using photodynamic therapy. *Lasers Med Sci* 24: 549-552.
271. Li LB, Luo RC (2009) Effect of drug-light interval on the mode of action of Photofrin photodynamic therapy in a mouse tumor model. *Lasers Med Sci* 24: 597-603.
272. Konan YN, Gurny R, Allemann E (2002) State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B* 66: 89-106.
273. Derycke AS, de Witte PA (2004) Liposomes for photodynamic therapy. *Adv Drug Deliv Rev* 56: 17-30.
274. Vargas A, Eid M, Fanchaouy M, Gurny R, Delie F (2008) In vivo photodynamic activity of photosensitizer-loaded nanoparticles: formulation properties, administration parameters and biological issues involved in PDT outcome. *Eur J Pharm Biopharm* 69: 43-53.
275. Bechet D, Couleaud P, Frochot C, Viriot ML, Guillemin F, et al. (2008) Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents. *Trends Biotechnol* 26: 612-621.
276. Shiah JJ, Sun Y, Peterson CM, Kopecek J (1999) Biodistribution of free and N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymer-bound mesochlorin e(6) and adriamycin in nude mice bearing human ovarian carcinoma OVCAR-3 xenografts. *J Control Release* 61: 145-157.
277. Chatterjee DK, Fong LS, Zhang Y (2008) Nanoparticles in photodynamic therapy: an emerging paradigm. *Adv Drug Deliv Rev* 60: 1627-1637.
278. Zhao B, Yin JJ, Bilski PJ, Chignell CF, Roberts JE, et al. (2009) Enhanced photodynamic efficacy towards melanoma cells by encapsulation of Pc4 in silica nanoparticles. *Toxicol Appl Pharmacol* 241: 163-172.
279. Couleaud P, Morosini V, Frochot C, Richeter S, Raehm L, et al. (2010) Silica-based nanoparticles for photodynamic therapy applications. *Nanoscale* 2: 1083-1095.
280. Peng CL, Yang LY, Luo TY, Lai PS, Yang SJ, et al. (2010) Development of pH sensitive 2-(diisopropylamino)ethyl methacrylate based nanoparticles for photodynamic therapy. *Nanotechnology* 21: 155103.

281. Li Z, Wang J, Chen J, Lei W, Wang X, et al. (2010) pH-responsive silica nanoparticles for controllable 1O<sub>2</sub> generation. *Nanotechnology* 21: 115102.
282. Hocine O, Gary-Bobo M, Brevet D, Maynadier M, Fontanel S, et al. (2010) Silicalites and Mesoporous Silica Nanoparticles for photodynamic therapy. *Int J Pharm* 402: 221-230.
283. Sharman WM, van Lier JE, Allen CM (2004) Targeted photodynamic therapy via receptor mediated delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev* 56: 53-76.
284. van Dongen GA, Visser GW, Vrouenraets MB (2004) Photosensitizer-antibody conjugates for detection and therapy of cancer. *Adv Drug Deliv Rev* 56: 31-52.
285. Schneider R, Schmitt F, Frochot C, Fort Y, Lourette N, et al. (2005) Design, synthesis, and biological evaluation of folic acid targeted tetraphenylporphyrin as novel photosensitizers for selective photodynamic therapy. *Bioorg Med Chem* 13: 2799-2808.
286. Zhang M, Zhang Z, Blessington D, Li H, Busch TM, et al. (2003) Pyropheophorbide 2-deoxyglucosamide: a new photosensitizer targeting glucose transporters. *Bioconjug Chem* 14: 709-714.
287. Savellano MD, Hasan T (2005) Photochemical targeting of epidermal growth factor receptor: a mechanistic study. *Clin Cancer Res* 11: 1658-1668.
288. Bhatti M, Yahioğlu G, Milgrom LR, Garcia-Maya M, Chester KA, et al. (2008) Targeted photodynamic therapy with multiply-loaded recombinant antibody fragments. *Int J Cancer* 122: 1155-1163.
289. Serebrovskaya EO, Edelweiss EF, Stremovskiy OA, Lukyanov KA, Chudakov DM, et al. (2009) Targeting cancer cells by using an antireceptor antibody-photosensitizer fusion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 9221-9225.
290. Fabbrini M, Trachsel E, Soldani P, Bindi S, Alessi P, et al. (2006) Selective occlusion of tumor blood vessels by targeted delivery of an antibody-photosensitizer conjugate. *Int J Cancer* 118: 1805-1813.
291. Brasseur N, Langlois R, La Madeleine C, Ouellet R, van Lier JE (1999) Receptor-mediated targeting of phthalocyanines to macrophages via covalent coupling to native or maleylated bovine serum albumin. *Photochem Photobiol* 69: 345-352.
292. Anatelli F, Mroz P, Liu Q, Yang C, Castano AP, et al. (2006) Macrophage-targeted photosensitizer conjugate delivered by intratumoral injection. *Mol Pharm* 3: 654-664.
293. Gijssens A, Derycke A, Missiaen L, De Vos D, Huwyler J, et al. (2002) Targeting of the photocytotoxic compound AlPcS<sub>4</sub> to HeLa cells by transferrin conjugated PEG-liposomes. *Int J Cancer* 101: 78-85.
294. Derycke AS, Kamuhabwa A, Gijssens A, Roskams T, De Vos D, et al. (2004) Transferrin-conjugated liposome targeting of photosensitizer AlPcS<sub>4</sub> to rat bladder carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* 96: 1620-1630.
295. Schmidt-Erfurth U, Diddens H, Birngruber R, Hasan T (1997) Photodynamic targeting of human retinoblastoma cells using covalent low-density lipoprotein conjugates. *Br J Cancer* 75: 54-61.
296. Song L, Li H, Sunar U, Chen J, Corbin I, et al. (2007) Naphthalocyanine-reconstituted LDL nanoparticles for in vivo cancer imaging and treatment. *Int J Nanomedicine* 2: 767-774.
297. Gijssens A, Missiaen L, Merlevede W, de Witte P (2000) Epidermal growth factor-mediated targeting of chlorin e6 selectively potentiates its photodynamic activity. *Cancer Res* 60: 2197-2202.
298. Tirand L, Frochot C, Vanderesse R, Thomas N, Trinquet E, et al. (2006) A peptide competing with VEGF<sub>165</sub> binding on neuropilin-1 mediates targeting of a chlorin-

- type photosensitizer and potentiates its photodynamic activity in human endothelial cells. *J Control Release* 111: 153-164.
299. Bechet D, Tirand L, Faivre B, Plenat F, Bonnet C, et al. (2010) Neuropilin-1 targeting photosensitization-induced early stages of thrombosis via tissue factor release. *Pharm Res* 27: 468-479.
  300. Hu Z, Rao B, Chen S, Duanmu J (2010) Targeting tissue factor on tumour cells and angiogenic vascular endothelial cells by factor VII-targeted verteporfin photodynamic therapy for breast cancer in vitro and in vivo in mice. *BMC Cancer* 10: 235.
  301. Rosenkranz AA, Lunin VG, Gulak PV, Sergienko OV, Shumiantseva MA, et al. (2003) Recombinant modular transporters for cell-specific nuclear delivery of locally acting drugs enhance photosensitizer activity. *Faseb J* 17: 1121-1123.
  302. Gilyazova DG, Rosenkranz AA, Gulak PV, Lunin VG, Sergienko OV, et al. (2006) Targeting cancer cells by novel engineered modular transporters. *Cancer Res* 66: 10534-10540.
  303. Ferrario A, Gomer CJ (2010) Targeting the tumor microenvironment using photodynamic therapy combined with inhibitors of cyclooxygenase-2 or vascular endothelial growth factor. *Methods Mol Biol* 635: 121-132.
  304. Bhuvanewari R, Gan YY, Soo KC, Olivo M (2009) Targeting EGFR with photodynamic therapy in combination with Erbitux enhances in vivo bladder tumor response. *Mol Cancer* 8: 94.
  305. Komath SS, Kavitha M, Swamy MJ (2006) Beyond carbohydrate binding: new directions in plant lectin research. *Org Biomol Chem* 4: 973-988.
  306. Pandey G, Fatma T, Komath SS (2009) Specific interaction of the legume lectins, concanavalin a and peanut agglutinin, with phycocyanin. *Photochem Photobiol* 85: 1126-1133.
  307. Pandey G, Fatma T, Cowsik SM, Komath SS (2009) Specific interaction of jacalin with phycocyanin, a fluorescent phycobiliprotein. *J Photochem Photobiol B* 97: 87-93.
  308. Goel M, Damai RS, Sethi DK, Kaur KJ, Maiya BG, et al. (2005) Crystal structures of the PNA-porphyrin complex in the presence and absence of lactose: mapping the conformational changes on lactose binding, interacting surfaces, and supramolecular aggregations. *Biochemistry* 44: 5588-5596.
  309. Kavitha M, Swamy MJ (2006) Thermodynamic studies on the interaction of water-soluble porphyrins with the glucose/mannose-specific lectin from garden pea (*Pisum sativum*). *IUBMB Life* 58: 720-730.
  310. Komath SS, Bhanu K, Maiya BG, Swamy MJ (2000) Binding of porphyrins by the tumor-specific lectin, jacalin [Jack fruit (*Artocarpus integrifolia*) agglutinin]. *Biosci Rep* 20: 265-276.
  311. Goel M, Anuradha P, Kaur KJ, Maiya BG, Swamy MJ, et al. (2004) Porphyrin binding to jacalin is facilitated by the inherent plasticity of the carbohydrate-binding site: novel mode of lectin-ligand interaction. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60: 281-288.
  312. Bies C, Lehr CM, Woodley JF (2004) Lectin-mediated drug targeting: history and applications. *Adv Drug Deliv Rev* 56: 425-435.
  313. Nakamura-Tsuruta S, Uchiyama N, Peumans WJ, Van Damme EJ, Totani K, et al. (2008) Analysis of the sugar-binding specificity of mannose-binding-type Jacalin-related lectins by frontal affinity chromatography--an approach to functional classification. *Febs J* 275: 1227-1239.
  314. Houles Astoul C, Peumans WJ, van Damme EJ, Barre A, Bourne Y, et al. (2002) The size, shape and specificity of the sugar-binding site of the jacalin-related lectins is

- profoundly affected by the proteolytic cleavage of the subunits. *Biochem J* 367: 817-824.
315. Kay NE, Bone N, Hupke M, Dalmaso AP (1990) Expansion of a lymphocyte population co-expressing T4 (CD4) and T8 (CD8) antigens in the peripheral blood of a normal adult male. *Blood* 75: 2024-2029.
  316. Brenner D, Krammer PH, Arnold R (2008) Concepts of activated T cell death. *Crit Rev Oncol Hematol* 66: 52-64.
  317. Zola H SB, Nicholson IC (2007) Leukocyte and stromal cell molecules: The CD markers. Book News; Wiley-Liss; Ed by Heddy Zola et al.
  318. Wu AM, Wu JH, Singh T, Chu KC, Peumans WJ, et al. (2004) A novel lectin (Morniga M) from mulberry (*Morus nigra*) bark recognizes oligomannosyl residues in N-glycans. *J Biomed Sci* 11: 874-885.
  319. Levade T, Malagarie-Cazenave S, Gouaze V, Segui B, Tardy C, et al. (2002) Ceramide in apoptosis: a revisited role. *Neurochem Res* 27: 601-607.
  320. Clancy L, Mruk K, Archer K, Woelfel M, Mongkolsapaya J, et al. (2005) Preligand assembly domain-mediated ligand-independent association between TRAIL receptor 4 (TR4) and TR2 regulates TRAIL-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 18099-18104.
  321. Wajant H, Gerspach J, Pfizenmaier K (2011) Engineering death receptor ligands for cancer therapy. *Cancer Lett.*
  322. Sadighi Akha AA, Berger SB, Miller RA (2006) Enhancement of CD8 T-cell function through modifying surface glycoproteins in young and old mice. *Immunology* 119: 187-194.
  323. Wang C, Ho PC, Lim LY (2010) Wheat germ agglutinin-conjugated PLGA nanoparticles for enhanced intracellular delivery of paclitaxel to colon cancer cells. *Int J Pharm* 400: 201-210.
  324. Bellnier DA, Ho YK, Pandey RK, Missert JR, Dougherty TJ (1989) Distribution and elimination of Photofrin II in mice. *Photochem Photobiol* 50: 221-228.
  325. Strasser A, Cory S, Adams JM (2011) Deciphering the rules of programmed cell death to improve therapy of cancer and other diseases. *Embo J.*
  326. del Carmen MG, Rizvi I, Chang Y, Moor AC, Oliva E, et al. (2005) Synergism of epidermal growth factor receptor-targeted immunotherapy with photodynamic treatment of ovarian cancer in vivo. *J Natl Cancer Inst* 97: 1516-1524.
  327. Gelfuso GM, Gratieri T, Souza JG, Thomazine JA, Lopez RF (2011) The influence of positive or negative charges in the passive and iontophoretic skin penetration of porphyrins used in photodynamic therapy. *Eur J Pharm Biopharm* 77: 249-256.
  328. Vrouenraets MB, Visser GW, Loup C, Meunier B, Stigter M, et al. (2000) Targeting of a hydrophilic photosensitizer by use of internalizing monoclonal antibodies: A new possibility for use in photodynamic therapy. *Int J Cancer* 88: 108-114.
  329. Vrouenraets MB, Visser GW, Stigter M, Oppelaar H, Snow GB, et al. (2002) Comparison of aluminium (III) phthalocyanine tetrasulfonate- and meta-tetrahydroxyphenylchlorin-monoclonal antibody conjugates for their efficacy in photodynamic therapy in vitro. *Int J Cancer* 98: 793-798.
  330. Chaloin L, Bigey P, Loup C, Marin M, Galeotti N, et al. (2001) Improvement of porphyrin cellular delivery and activity by conjugation to a carrier peptide. *Bioconjug Chem* 12: 691-700.
  331. Lam SK, Ng TB (2010) Lectins: production and practical applications. *Appl Microbiol Biotechnol.*

332. Shan L (2004-2009) [Biotinylated anti-Tn MLS128 monoclonal antibody-125I-streptavidin]. In Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD) [Internet] Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US).
333. Rabijns A, Barre A, Van Damme EJ, Peumans WJ, De Ranter CJ, et al. (2005) Structural analysis of the jacalin-related lectin MornigaM from the black mulberry (*Morus nigra*) in complex with mannose. *Febs J* 272: 3725-3732.
334. Kruyt FA (2008) TRAIL and cancer therapy. *Cancer Lett* 263: 14-25.
335. Juo P, Woo MS, Kuo CJ, Signorelli P, Biemann HP, et al. (1999) FADD is required for multiple signaling events downstream of the receptor Fas. *Cell Growth Differ* 10: 797-804.
336. Milhas D, Cuvillier O, Therville N, Clave P, Thomsen M, et al. (2005) Caspase-10 triggers Bid cleavage and caspase cascade activation in FasL-induced apoptosis. *J Biol Chem* 280: 19836-19842.
337. Juo P, Kuo CJ, Yuan J, Blenis J (1998) Essential requirement for caspase-8/FLICE in the initiation of the Fas-induced apoptotic cascade. *Curr Biol* 8: 1001-1008.
338. Lafont E, Milhas D, Carpentier S, Garcia V, Jin ZX, et al. (2009) Caspase-mediated inhibition of sphingomyelin synthesis is involved in FasL-triggered cell death. *Cell Death Differ*.
339. Casas C, Saint-Jalmes B, Loup C, Lacey C, Meunier B (1993) Synthesis of cationic metalloporphyrin precursors related to the design of DNA cleavers. *J Org Chem* 58: 2913-2917.
340. Negre-Salvayre A, Auge N, Duval C, Robbesyn F, Thiers JC, et al. (2002) Detection of intracellular reactive oxygen species in cultured cells using fluorescent probes. *Methods Enzymol* 352: 62-71.

