#### UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

### **THESE**

pour l'obtention du grade de

#### Docteur de l'Université de Lille 1

Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

présentée par

#### Valegh FAID

# Approches de glycomique appliquées à l'étude des pathologies métaboliques des glycoprotéines

Soutenue publiquement le 10 Avril 2008

Composition du jury :

Monsieur le Dr Gilbert BRIAND Monsieur le Dr Willy MORELLE Monsieur le Pr Nico CALLEWAERT Madame le Pr Nathalie SETA Monsieur le Dr Jean-Claude MICHALSKI Monsieur le Dr Nicolas BIHOREAU Président Directeur de thèse Rapporteur Rapporteur Examinateur Examinateur

A mes parents et mes frères et sœur, A Fazia,

Pour votre amour, votre soutien, votre confiance et votre patience.







Ce travail a été réalisé au sein de l'Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle (UGSF), Unité Mixte de Recherche USTL/CNRS n° 8576, dirigée par le Dr Jean-Claude Michalski. Il a bénéficié d'une allocation de recherche du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. Ce travail a été encadré par le Dr Willy Morelle.

#### Remerciements

Je veux tout d'abord remercier le Dr Jean-Claude Michalski pour m'avoir accueilli dans son groupe de recherche, pour sa bonne humeur, et sa confiance. Vous avez toujours été présent pour me permettre de surmonter toutes les difficultés. Vous m'avez également accordé votre confiance en m'accordant pleine liberté de réaliser l'ensemble de mes projets scientifiques et finalement permis d'arriver là où je suis... Pour tout cela, veuillez trouver l'expression de mon infinie gratitude et de mon profond respect.

Je remercie également le Dr Willy Morelle d'avoir dirigé cette thèse et pour l'ensemble des enseignements prodigués. Malgré les difficultés, au combien nombreuses, au regard des nombreux challenges que nous avions à relever au quotidien, tu as pu me permettre de mener à bien l'ensemble de mes divers projets scientifiques.

Je veux également témoigner toute ma gratitude à Marie-Christine Slomianny, à qui je dois énormément. Tout au long de mon cursus doctoral, j'ai pu compter sur vous à chaque instant et vous avez toujours su trouver les mots pour me soutenir, quand ça n'allait pas... Vous avez également beaucoup contribué à mon épanouissement professionnel, par vos enseignements et votre expertise de qualité. Veuillez trouver le témoignage de ma plus sincère reconnaissance.

Je veux témoigner toute mon infinie gratitude et mon affection au Dr Frédéric Chirat, pour son amitié, ses innombrables conseils et enseignements d'une qualité exceptionnelle et rare. « *Oh my dear friend…* », tu as occupé une place prépondérante dans ma vie … étudiante ! Tu m'as en effet appris la biochimie, et à la pratiquer intelligemment. De fait, tu as principalement contribué à mon épanouissement professionnel. Pour tout cela, reçois l'expression de ma plus sincère reconnaissance et de ma profonde amitié.

Je remercie très chaleureusement les Drs Calliope Capon et Catherine Robbe-Masselot. J'ai également pu compter sur votre soutien et vos conseils avisés, qui m'ont permis de surmonter bon nombre d'obstacles. Pour cela, recevez toute mon affection.

Je tiens à transmettre mon plus profond respect et ma plus sincère reconnaissance au Dr Gilbert Briand pour m'avoir fait l'honneur de présider mon jury de thèse. Je transmets également ma plus sincère gratitude aux Prs Nathalie Séta et Nico Callewaert, pour m'avoir fait l'honneur d'être les rapporteurs de ma thèse.

Je remercie infiniment le Dr Nicolas Bihoreau, pour avoir examiné ma thèse, mais également pour m'avoir fait l'honneur de me compter parmi ses collaborateurs dans la mission de caractérisation structurale des glycoprotéines thérapeutiques, au sein du service de caractérisation structurale, au sein de la Direction du Développement Biopharmaceutique du Laboratoire Français du Fractionnement et des Biotechnologies (LFB, Les Ulis).

Je veux également remercier le reste de l'équipe « Glycobiologie de la signalisation cellulaire » : Pr René Cacan, Dr André klein, Dr Tony Lefebvre, Dr Sandrine Duvet, Dr François Foulquier, Dr Anne-Sophie Vercoutter-Edouart, Anne-Marie Mir, Vanessa Dehennaut et Coralie Bernon), pour m'avoir si chaleureusement accueilli et soutenu (et/ou supporté) tout au long de ces quatre années.

Je veux également remercier l'ensemble des personnes qui ont contribuées de près ou de loin à l'élaboration et à la concrétisation de cette thèse, et plus particulièrement : Yves Leroy, qui m'a enseigné l'art chromatographique mais également aidé à surmonter bon nombre de difficultés analytiques ... ; le Dr Gérard Strecker, auprès duquel j'ai pu bénéficier, en l'espace de courts et rares instants, certes, de précieux enseignements de glycobiologie structurale ; le Pr René Cacan, qui m'a aidé à mieux comprendre le métabolisme des glycoprotéines et à la préparation de mes divers projets de recherche. Recevez tous l'expression de ma plus profonde reconnaissance.

Je tiens également à transmettre ma plus profonde gratitude et toute mon amitié à l'ensemble du personnel de l'unité qui m'a fait profiter de sa bonne humeur, de sa capacité d'écoute et de son affection, qui constituent autant de facteurs ayant contribués à mon épanouissement et à mon bien-être au sein de cette unité, au cours de ces quatre années. Je pense plus particulièrement à mes compagnons d'armes : Yoann, Djamel, Lokmane, Julie et Kévin ; et à Michelle, Gaëlle, Nadège, Cathie, Sonia, Philippe, Marlène. Pardon, à tous ceux et celles que j'aurai oublié(e)s...

#### **RESUME :**

Les glycannes des glycoprotéines sont impliqués dans de multiples processus biologiques, tels que l'inflammation, l'immunité, le développement et la reproduction. Ils sont responsables des nombreuses propriétés physicochimiques, immunologiques et biologiques des glycoprotéines. Ils peuvent, de fait, moduler les propriétés pharmacologiques des glycoprotéines recombinantes thérapeutiques. Leur importance a également été démontrée par la sévérité des présentations cliniques et les taux de morbidité / mortalité des CDG. Cependant, la médecine moderne manque cruellement d'outils glycobioanalytiques permettant l'exploration de ces métabolismes, à grand échelle. Les objectifs de notre thèse étaient donc fondés sur la mise au point d'approches et d'outils glycobioanalytiques, basés sur l'utilisation de la spectrométrie de masse, appliqués à l'étude de la glycosylation d'une glycoprotéine d'intérêt biologique, l'α-mannosidase lysosomale (LAMAN), et à l'étude de fluides biologiques d'intérêt, tels que le plasma sanguin et l'urine, qui regorgent de précieux glycobiomarqueurs diagnostiques et/ou pronostiques spécifiques, formés au cours de pathologies congénitales de la biosynthèse (CDG) et du catabolisme (glycoprotéinoses) des glycoprotéines. La première partie de notre travail de thèse a consisté en la caractérisation structurale de la glycosylation de la LAMAN bovine, qui constitue notre modèle d'étude de la LAMAN humaine et de la pathogénèse moléculaire de l'a-mannosidose. Nous avons pu déterminer la structure détaillée d'une vingtaine de N-glycannes ainsi que leurs positions sur six des huit sites de glycosylation de la LAMAN bovine. Les résultats obtenus constituent une base solide pour l'étude de la glycosylation de la LAMAN humaine recombinante, dédiée à l'évaluation de son efficacité thérapeutique dans le traitement expérimental de l'amannosidose. La seconde partie de notre travail de thèse a consisté en la mise au point de méthodologies de glycomique dédiées au profilage et à la caractérisation structurale de glycobiomarqueurs urinaires diagnostiques des glycoprotéinoses. Dans un premier temps, nous décrivons une méthode de profilage complet des oligosaccharides et des glycoasparagines urinaires perméthylés, par MALDI-TOF-MS, reflets du catabolisme lysosomal des glycoprotéines cellulaires, par la microanalyse de 20 µL d'urine de patients. Dans un second temps, appliquée à l'étude des oligosaccharides urinaires d'un patient atteint structures, jamais décrites chez l'homme. Enfin, la dernière partie de notre travail de thèse a consisté en la mise au point d'une approche glycobioanalytique globale permettant d'explorer les processus de glycosylation des protéines. Dans cette étude, nous décrivons une méthode de profilage rapide du N- et du O-glycome des glycoprotéines sériques totales par MALDI-TOF-MS, par la microanalyse de 30 µL de sérum, permettant la détection et la caractérisation de glycoformes anormales, formées au cours des CDG. Appliquées au sérum de patients souffrant de CDG-IIa et d'une déficience en protéine COG 1, cette stratégie a permis de mettre en évidence et de caractériser de précieux glycobiomarqueurs diagnostiques de ces maladies.

#### **ABSTRACT:**

Glycoprotein-derived glycans are involved in numerous biological processes, such as inflammation, immunity, development and reproduction. They are responsible for numerous physicochemical, immunological and biological properties of glycoproteins, and, they can modulate the pharmacological properties of therapeutic recombinant glycoproteins. Their importance has been demonstrated by the severity of the clinical pictures and the high level of morbidity and mortality of patients suffering from congenital disorders of glycosylation (CDG). Therefore, in the field of clinical chemistry, there is a lack of glycobioanalytical tools for the exploration of the glycoprotein-derived glycan metabolism. Then, the objectives of our thesis was founded on the development of glycobioanalytical approaches, relied on mass spectrometry, applied to the study of the glycosylation of biologically interesting glycoproteins, such as LAMAN, or biological fluids, such as blood plasma and urine, known to contain numerous specific diagnostic and/or prognostic glycobiomarkers, yielded during congenital defect in the biosynthesis (CDG) and in the catabolism (glycoproteinoses) of glycoprotein-derived glycans. The first step of our thesis consisted in the site-specific glycosylation analysis of bovine LAMAN, which constitutes our model of study of the human enzyme and of the molecular pathogenesis of  $\alpha$ -mannosidosis. The detailed structures as well as their distribution within six of eight glycosylation sites were determined. These results constitute a solid basis of work for the site-specific glycosylation analysis of the human recombinant LAMAN, in order to evaluate its therapeutic efficiency in the experimental treatment of  $\alpha$ -mannosidosis. The second step of our thesis consisted in the elaboration of mass spectrometric methodologies for the profiling as well as the structural characterization of the urinary oligosaccharides and glycoasparagines, as valuable glycoproteinosis-associated glycobiomarkers. Applied to the mass profiling of urinary oligosaccharides of a patient suffering from β-mannosidosis, nine new structures, never described in man, were identified and partially characterized. Finally, the last part of our thesis consisted in the elaboration of a global glycobioanalytical methodology, enabling the exploration of glycosylation processes of cellular proteins. In this study, we described a rapid mass spectrometric strategy for the structural characterization of N- and O-glycan chains in the diagnosis of genetic defects in glycan biosynthesis. Applied to patients suffering from CDG-IIa and CDG-IIg, valuable diagnostic glycobiomarkers were identified.

#### **PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS**

#### Publications :

Faid V., Evjen G, Tollersrud O-K, Michalski JC, Morelle W. "Site-specific glycosylation analysis of the bovine lysosomal α-mannosidase", Glycobiology (2006); 16(5): 440-461.

Morelle W, Canis K, Chirat F, Faid V, Michalski JC. "The use of mass spectrometry for the proteomic analysis of glycosylation", Proteomics (2006); 6(14): 3993-4015.

**Faid V.**, Chirat F., Séta N., Foulquier F., Michalski J.C., Morelle W. **"A rapid mass spectrometric strategy for the characterization of N- and O-glycan chains in the diagnosis of defects in glycan biosynthesis",** Proteomics (2007); 7(11):1800-1813.

Faid V., Michalski J.C. Chirat F., Morelle W. "A mass spectrometric strategy for profiling glycoproteinoses, Pompe disease and sialic acid storage diseases". Soumis à publication dans Proteomics (2007).

Morelle W., Faid V., Chirat F., Michalski J.C. "Analysis of N- and O-Linked glycans from glycoproteins using MALDI-TOF mass spectrometry", N. Parker and N. Karlsson (ed.), Glycomic and Glycoproteomic Approaches, Methods in Molecular Biology book series, published by Humana Press, USA (2009); vol. 534.

#### Communications orales :

**Faid V.**, Evjen G., Tollersrud O.-K., Michalski J.C. and Morelle W. "Site-specific glycosylation analysis of the bovine lysosomal  $\alpha$ -mannosidase", 191<sup>èmes</sup> journées de la Société Belge de Biochimie et de Biologie Moléculaire, Bruxelles, Belgique, Décembre 2005.

**Faid V.**, Evjen G., Tollersrud O.-K., Michalski J.C. and Morelle W. **"Analyse de l'hétérogénéité N-glycannique par site de l'α-mannosidase lysosomale bovine"**, XXI<sup>èmes</sup> Journées du Groupe Français des Glucides, Le Croisic, France, Mai 2006.

#### Communications par affiches :

Morelle W., Faid V. and Michalski J.C. **"Structural analysis of permethylated oligosaccharides using electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry and deuteroreduction"**, XV<sup>èmes</sup> journées conjointes de la "Studiengruppe Glykobiologie der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie", la "Nederlandse Vereniging voor Glycobiologie" et le "Groupe Lillois de Glycobiologie" (Joint Meeting), Wageningen, Pays-Bas, Novembre 2004.

**Faid V.**, Evjen G., Tollersrud O.-K., Michalski J.C. and Morelle W. "Site-specific glycosylation analysis of the bovine lysosomal  $\alpha$ -mannosidase", XVI<sup>èmes</sup> journées conjointes de la "Studiengruppe Glykobiologie der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie", la "Nederlandse Vereniging voor Glycobiologie" et le "Groupe Lillois de Glycobiologie" (Joint Meeting), Hannover, Allemagne, Novembre 2005.

**Faid V.**, Chirat F., Séta N., Foulquier F., Michalski J.C. and Morelle W. **"A rapid mass spectrometry strategy for the characterization of N- and N-glycan chains in the diagnosis of defects in glycan biosynthesis"**, XVII<sup>èmes</sup> journées conjointes de la "Studiengruppe Glykobiologie der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie", la "Nederlandse Vereniging voor Glycobiologie" et le "Groupe Lillois de Glycobiologie" (Joint Meeting), Bruges, Belgique, Novembre 2006.

2-AB	2-aminobenzamide	
2-AP	2-aminopyridine	
ALG	Asparagine-linked glycans	
ADN	Acide déoxyribonucléique	
amole	attomole	
ANTS	Acide 8-aminonaphtalène-1,3,6-trisulfonique	
apo-CIII	apolipoprotéine C-III	
APTS	Acide 1-aminopyrène-3,6,8-trisulfonique	
ARN	Acide ribonucléique	
Asn	Asparagine	
ATP	Adénosine triphosphates	
Benz	Benzylamine	
ССМ	Chromatographie sur couche mince	
CD	Cell differenciation	
CDA	Congenital dyserythropoïetic anaemia	
CDG	Congenital disorders of glycosylation	
CE	Capillary electrophoresis	
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator	
СНО	Chinese hamster ovary	
CI	Chemical ionization	
CID	Collision induced dissociation	
CMD	Congenital muscular dystrophy	
COMSC	Core 1 ( $\beta$ 1-3)-Gal T-specific molecular chaperone	
COG	Conserved oligomeric Golgi complex	
Con A	Concanavaline A	
Cys	Cystéine	
DHB	Acide 2,5-dihydroxybenzoïque	
dHex	Déoxyhexose	
Dol	Dolichol	
ECD	Electron capture dissociation	
EGF	Epidermal growth factor	
Endo H	Endo-N-acétyl-β-glucosaminidase H	
EPO	Erythropoïétine	
ETD	Electron transfert dissociation	
ERGIC	ER / Golgi apparatus intermediary compartment	
eV	Electron-volt	
EXT	Exostosine	

FACE	Fluorofore-assisted carbohydrate electrophoresis		
Fc-R	Récepteur au fragment clivage des immunoglobulines (Ig)		
FKRP	Fukutin-related protein		
fmole	Femtomole		
FSH	Follicle-stimulating hormone		
FTICR	Fourier transform ion cyclotronic resonance		
Fuc	Fucose		
FUT	Fucosyltransférase		
GAG	Glycosaminoglycannes		
Gal	Galactose		
GC-EI-MS	Gaz chromatography-electronic impact-mass spectrometry		
GDP	Guanosine diphosphates		
Glc	Glucose		
GlcNAc	N-acétylglucosamine		
GLUT	Glucose transporters		
GNE/MNK	UDP-GlcNAc 2-épimérase/ManNAc-6-kinase		
GRP78	Glucose-regulated protein-78 kDa		
HCG	Human chorionic gonadotrophin		
HEMPAS	Heriditary erythroblastic multinuclearity with a positive		
	acidified-serum lysis test		
Hex	Hexose		
HexNAc	N-acétylhexosamine		
HexUA	Acide hexuronique		
HILIC	Hydrophilic interaction liquid chromatography		
НМЕ	Hereditary multiple exostoses		
HPLC	High performance liquid chromatography		
IEF	Isoélectrofocalisation		
IL	Interleukine		
INF	Interféron		
ISSD	Infantile sialic acid storage disease		
IT	Ion trap		
КО	Knock-out		
LacdiNAc	N,N'-diacétyllactosamine		
LacNAc	N-acétyllactosamine		
LAD	Leukocyte adhesion deficiency		
LAMAN	α-mannosidase lysosomale		
LAMP	Lysosome-associated membrane proteins		

LARGE	POMGT-like		
Le	Lewis		
LIT	Linear ion trap		
LH	Luteinizing hormone		
m/z	Rapport masse/charge		
[M+nH] <sup>n+</sup>	Ions moléculaires protonés		
[M+nNa] <sup>n+</sup> /[M+nK] <sup>n+</sup>	Ions pseudomoléculaires ou adduits sodés / potassiques		
MALDI-TOF-MS	Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight-mass		
	spectrometry		
Man	Mannose		
Man-1-P	Mannose-1-phosphate		
Man-6-P	Mannose-6-phosphate		
MBP	Mannose-binding protein		
MEB	Muscle-eye-brain		
MPR	Mannose-6-phosphate receptor		
MPS	Mucopolysaccharidose		
Nano-ESI-Q-TOF-MS/MS	Nano-electrospray ionization-quadrupole-time of flight		
	tandem mass spectrometry		
NeuAc	Acide N-acétyl-α-neuraminique		
NeuGc	Acide N-glycolyl-α-neuraminique		
NP	Normal Phase		
OMIM	On-line mendelian inheritance in man		
OS	Oligosaccharide		
OST	Oligosaccharyltransférase		
Р	Phosphate		
PAD	Pulsed amperometric detection		
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis		
PAPS	3'-phosphoadénosine-5'-phosphosulfate		
PDB	Protein Data Bank		
PDE	Phosphodiestérase		
PEP	Phosphoènolpyruvate		
РМАА	Partially methylated acetylated alditols		
PMM	Phosphomannomutase		
PMI	Phosphomannoisomérase		
pmole	picomole		
PNGase F	Peptidyl-N-Glycosidase F		
РОМТ	GDP-Man : Protéine O-Man T		

POMGT	UDP-GlcNAc : Protéine-O-Man (β1-2)-GlcNAc T
PPase	Pyrophosphorylase
PrP	Prion protein
RE	Réticulum Endoplasmique
RNase	Ribonucléase
RP	Reverse Phase
SAM	S-adénosylméthionine
Ser	Sérine
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl-Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
SGLT	Sodium / Glucose transporters
SIGLEC	Sialic acid-binding IgG-like lectins
STf	Sérotransferrine
Т	Transférase
ТВР	Tyroxin-binding protein
Th	Thomson
ТНАР	2,4,6-trihydroxyacétophénone
Thr	Thréonine
TLR	Toll-like receptor
TIC	Total Ionic Current
Тгр	Tryptophane
TSH	Thyrotrophin-stimulating hormone
TSR	Thrombospondine 1-repeats
Tyr	Tyrosine
UDP	Uridine diphosphates
UV	Ultra-violet
Xyl	Xylose

#### TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION & OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THESE
EXPOSE BIBLIOGRAPHIQUE
CHAPITRE I : LA GLYCOSYLATION DES PROTEINES
A-Introduction
B-Les monosaccharides composant les glycoprotéines 4
C-Les différents types de glycosylation 5
1-La N-glycosylation
2-La O-glycosylation
3-La C-glycosylation
D-Structures des chaînes glycanniques des glycoprotéines10
1-Structure des N-glycannes10
2-Structure des O-glycannes de type mucine13
E-Fonctions des glycannes des glycoprotéines15
1-Modulation des propriétés physicochimiques des glycoprotéines
1.1-Influence des glycannes sur la solubilité et la stabilité des glycoprotéines16
1.2-Influence des glycannes sur le repliement et l'oligomérisation des glycoprotéines17
1.3-Influence des glycannes sur la résistance vis-à-vis des protéases18
2-Modulation des propriétés biologiques et immunologiques des glycoprotéines
2.1-Influence des glycannes sur les activités enzymatiques des glycoprotéines
2.2-Influence des glycannes sur les activités de signalisation des glycoprotéines
2.3-Influence des glycannes sur les propriétés immunologiques des glycoprotéines
2.4-Influence des glycannes sur la clairance des glycoprotéines circulantes
3-Modulation des processus biologiques par les glycannes des glycoprotéines
F-Métabolisme des glycoprotéines 23
1-Biosynthèse des glycoprotéines
1.1-Généralités sur la biosynthèse des glycoprotéines23
1.2-Métabolisme des nucléotide-sucres25
1.3-Biosynthèse des N-glycannes
1.3.1-Initiation de la N-glycosylation au niveau du RE27
1.3.1.1-Assemblage du précurseur tétradécasaccharidique27
1.3.1.2-Transfert du précurseur tétradécasaccharidique28
1.3.1.3-Contrôle-qualité des N-glycosylprotéines néosynthétisées
1.3.2-Maturation des N-glycannes au niveau de l'appareil de Golgi
1.3.2.1-Formation du signal d'adressage des enzymes lysosomaux

1.3.2.2-Biosynthèse des N-glycannes de type complexe et de type hybride	
1.3.3-Biosynthèse des O-glycannes	
2-Catabolisme des glycoprotéines	
2.1-Catabolisme cytoplasmique des glycoprotéines	
2.2-Catabolisme lysosomal des glycoprotéines	41
2.2.1-Généralités sur le catabolisme lysosomal des glycoprotéines	41
2.2.2-Transport des glycoprotéines vers le lysosome	41
2.2.3-Catabolisme lysosomal des glycoprotéines	
2.2.3.1-Protéolyse	
2.2.3.2-Dégradation des N-glycosylprotéines	
2.2.3.3-Dégradation des O-glycosylprotéines	46
CHAPITRE II : LES PATHOLOGIES DU METABOLISME DES GLYCOPROTEIN	ES 47
A-Les pathologies de la biosynthèse des glycoprotéines	
1-Les anomalies congénitales de la glycosylation des protéines (CDG)	47
1.1-Définition et classification des CDG	47
1.2-Présentations cliniques	47
1.3-Bases moléculaires des CDG	49
1.3.1-Les anomalies congénitales affectant la N-glycosylation	
1.3.1.1-Les CDG-I	49
1.3.1.2-Les CDG-II	
1.3.1.3-Les mucolipidoses II et III	
1.3.1.4-Les autres anomalies congénitales de la N-glycosylation	
a-La galactosémie congénitale	
b-L'intolérance congénitale au fructose	
c-L'anémie dysérythropoïétique congénitale type II	54
d-La « N-hyperglycosylation »	54
1.3.2-Les anomalies congénitales affectant la O-glycosylation	
1.3.2.1-Les anomalies congénitales de la O-glycosylation de type O-GalNAc	55
1.3.2.2-Les anomalies congénitales de la O-glycosylation de type O-Man	55
1.3.2.3-Les anomalies congénitales de la O-glycosylation de type O-Xyl	
1.3.2.4-Les anomalies congénitales de la O-glycosylation de type O-Fuc	
1.3.2.5-Les anomalies congénitales de la O-glycosylation de type O-Gal	
1.3.2.6-Les anomalies congénitales de la sialylation des O-glycannes	
1.4-Dépistage et étiquetage des CDG	
1.4.1-Dépistage des CDG	
1.4.2-Stratégies de typage des CDG	61

2-Les anomalies acquises de la glycosylation des protéines	63
2.1-Les cancers	63
2.2-L'alcoolisme et les pathologies hépatiques chroniques	64
2.3-Les pathologies inflammatoires chroniques	64
2.4-La néphropathie à IgA	65
2.5-La mucoviscidose	66
B-Les pathologies congénitales du catabolisme des glycoprotéines	66
1-Définitions des anomalies du catabolisme lysosomal des glycoprotéines	66
2-Présentations cliniques des patients	67
3-Bases moléculaires des glycoprotéinoses et des mucopolysaccharidoses	68
3.1-Les glycoprotéinoses	68
3.1.1-La sialidose et la galactosialidose	68
3.1.2-La maladie de Morquio type B	69
3.1.3-La maladie de Sandhoff	70
3.1.4-L'α-mannosidose	70
3.1.5-La β-mannosidose	71
3.1.6-L'aspartylglucosaminurie	71
3.1.7-La fucosidose	72
3.1.8-Les maladies de Schindler et de Kanzaki	73
3.2-Les mucopolysaccharidoses	73
4-Dépistage et typage des anomalies congénitales du catabolisme des glycoprotéines	74
C-Les anomalies du métabolisme de l'acide sialique	75
1-Le métabolisme de l'acide sialique	75
2-Les sialuries	76
2.1-La sialurie type français	76
2.2-La sialurie type Salla (ou type finlandais) et ses formes sévères	77
2.3-Dépistage et typage des sialuries	77
CHAPITRE III : LES APPROCHES SPECTROMETRIQUES DE GLYCOMIQUE	
A-Introduction	
B-Généralités sur la spectrométrie de masse	80
1-Les sources d'ionisation	
2-Les analyseurs	
3-La spectrométrie de masse en tandem	
C-Les différentes approches spectrométriques de glycomique	
1-L'analyse glycomique de glycoprotéines entières	
2-L'analyse glycomique de glycopeptides protéolytiques	

2.1-Préparation des glycopeptides	. 87
2.2-Profilage et caractérisation des N- et O-glycomes par site et identification des sites	de
glycosylation	. 89
2.3-Analyse des glycopeptides par MS	. 89
3-L'analyse glycomique des chaînes glycanniques libérées	. 92
3.1-Libération des glycannes	. 92
3.2-Profilages chromatographiques et électrophorétiques des N- et O-glycomes	. 92
3.2-Profilage et caractérisation des N- et O-glycomes des glycoprotéines par MS	. 93
3.2.1-Profilage des N- et O-glycomes des glycoprotéines par MS	. 93
3.2.2-Caractérisation de la structure primaire des glycannes par MS	. 96
3.2.2.1-Séquençage et localisation des points de branchement des glycannes par MS	96
3.2.2.2-Positionnement des liaisons interglycosidiques par MS	. 99
TRAVAUX PERSONELS	101
CHAPITRE I : RELATION STRUCTURE-FONCTION DE LA GLYCOSYLATION DE I	Ľ'α-
MANNOSIDASE HUMAINE (rhLAMAN): DETERMINATION DE L'HETEROGENE	ITE
GLYCANNIQUE PAR SITE DE LA LAMAN BOVINE (bLAMAN)	101
1-INTRODUCTION ET OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE	101
1.1-Introduction	101
1.2-Objectifs du travail de thèse	103
2-RESULTATS	104
3-DISCUSSION	105
CHAPITRE II : APPROCHES DE GLYCOMIQUE POUR LE PROFILAGE ET	LA
CARACTERISATION DES OLIGOSACCHARIDURIES ET DES SIALURIES	109
1- INTRODUCTION ET OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE	109
1.1-Introduction	109
1.2-Objectifs du travail de thèse	110
2-RESULTATS	110
2.1-Profilage spectrométrique des oligosacchariduries et des sialuries	110
2.2-Identification et caractérisation de nouveaux oligosaccharides excrétés dans l'urine d	l'un
patient atteint de β-mannosidose	111
2.2.1-Profilage MALDI-MS des oligosaccharides urinaires perméthylés de β-mannosidose	111
2.2.2-Séquençage et positionnement des points de branchement des oligosaccharides urina	ires
deutéroréduits perméthylés par nano-ESI-MS/MS	112

2.2.3-Détermination de la séquence primaire et de la configuration des c	arbones anomériques
par la dégradation exoglycosidasique et chimique séquentielle des oligo	saccharides urinaires
deutéroduits	
3-DISCUSSION	

CHAPITRE III : PROFILAGES SPECTROMETRIQUES DU N- ET DU O-G	LYCOME DES
GLYCOPROTEINES SERIQUES POUR LE DIAGNOSTIC DES	ANOMALIES
CONGENITALES DE GLYCOSYLATION	
1- INTRODUCTION ET OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE	
1.1-Introduction	
1.2-Objectifs du travail de thèse	
2-RESULTATS	
3-DISCUSSION	
ANNEXE	126
CONCLUSION GENERALE	
REFERENCES RIBI IOGRAPHIOUES	178
	140

# INTRODUCTION & OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THESE

Bon nombre de questions biologiques fondamentales ont trouvé leur réponse dans l'étude de la structure, du métabolisme et des fonctions biologiques des glycoconjugués, qui constitue la principale mission de la glycobiologie. Les glycoconjugués résultent de l'association covalente d'une chaîne glycannique à une protéine ou à un lipide, pour respectivement donner les glycoprotéines et les glycolipides. Dans ce manuscrit, nous nous intéresserons plus spécifiquement à la glycobiologie des glycoprotéines. Au cours des dernières décennies, des efforts considérables ont été réalisés dans la compréhension des rôles, au combien nombreux, joués par les glycannes des glycoprotéines dans les systèmes biologiques. Ils sont responsables des nombreuses propriétés physicochimiques, immunologiques et biologiques des glycoprotéines recombinantes thérapeutiques. Grâce, notamment, à leurs propriétés d'interagir avec les lectines, les glycannes jouent un rôle de premier plan dans l'inflammation, l'immunité, le développement et la reproduction. Leur importance a également été démontrée par la sévérité des présentations cliniques et les taux de morbidité et de mortalité importants des patients souffrant de pathologies métaboliques congénitales des glycoprotéines.

A l'heure actuelle, la médecine moderne manque cruellement d'outils glycobioanalytiques avancés permettant l'exploration de ces métabolismes à grande échelle. Toutes ces données ont conduit à la naissance d'une nouvelle branche de la glycobiologie, la glycomique, une nouvelle science holistique qui a pour mission le développement d'approches et d'outils analytiques globaux, dédiés au profilage et à la caractérisation structurale de l'ensemble des chaînes glycanniques liées aux protéines exprimées dans un type cellulaire ou un fluide biologique donné, à un instant donné et dans des conditions de développement données.

Les objectifs de notre thèse ont donc été fondés sur la mise au point d'approches et d'outils de glycomique, basés sur l'utilisation de la spectrométrie de masse (MS), appliqués à l'étude de la glycosylation de glycoprotéines d'intérêt biologique, comme l' $\alpha$ -mannosidase lysosomale (LAMAN), et à l'étude de fluides biologiques d'intérêt, tels que le plasma sanguin et l'urine, qui regorgent de précieux glycobiomarqueurs potentiellement diagnostiques et/ou pronostiques spécifiques, formés au cours des pathologies congénitales de la biosynthèse (CDG) et de la dégradation (glycoprotéinoses) des glycoprotéines.

La première partie de notre travail de thèse a consisté en la caractérisation structurale de la glycosylation d'une glycoprotéine d'intérêt biologique, la LAMAN bovine, qui constitue également notre modèle d'étude de la LAMAN humaine et de la pathogénèse de l' $\alpha$ -

mannosidose. Ce travail s'inscrit dans le cadre d'un programme de recherche européen « EURAMAN », dont les objectifs consistent en l'élucidation des mécanismes moléculaires associés à la pathogénèse de l' $\alpha$ -mannosidose et en la conception de stratégies thérapeutiques. Dans le cadre de ce projet, les travaux, initiés au sein de notre laboratoire, sont consacrés à : (1) l'étude de la relation structure-fonction de la glycosylation de la LAMAN, et (2) l'évaluation de l'efficacité thérapeutique de la rhLAMAN, dans le traitement expérimental de l' $\alpha$ -mannosidose. Les résultats obtenus sur la bLAMAN constituent une base solide pour l'étude de la glycosylation de la LAMAN humaine recombinante, qui, à terme, permettra d'évaluer ses propriétés pharmacologiques, dans le traitement expérimental de l' $\alpha$ -mannosidose, pouvant être influencées par la structure de ses glycannes.

La seconde partie de notre travail de thèse a consisté en la mise au point de méthodologies de glycomique, dédiées au profilage et à la caractérisation structurale de glycobiomarqueurs urinaires diagnostiques des glycoprotéinoses. Dans un premier temps, nous décrivons une méthode de profilage complet des oligosaccharides et des glycoasparagines urinaires perméthylés, reflets du catabolisme lysosomal des glycoprotéines cellulaires, par MALDI-TOF-MS, à partir de la microanalyse de 20  $\mu$ L d'urine de patients. Dans un second temps, appliquée à l'étude des oligosaccharides urinaires d'un patient atteint d'une  $\beta$ -mannosidose, nous avons pu identifier et caractériser neuf nouvelles structures, jamais décrites chez l'homme.

La dernière partie de notre travail de thèse a consisté en la mise au point d'une approche glycobioanalytique globale permettant d'explorer les processus de glycosylation des protéines. Dans cette étude, nous décrivons une méthode de profilage rapide du N- et du O-glycome des glycoprotéines sériques totales par MALDI-TOF-MS, par la microanalyse de 30  $\mu$ L de sérum, permettant la détection et la caractérisation de glycoformes anormales, formées au cours des CDG. Appliquées au sérum de patients souffrant de CDG-IIa et d'une déficience en protéine COG 1, cette stratégie a permis de mettre en évidence et de caractériser de précieux glycobiomarqueurs diagnostiques de ces maladies.

Avant d'exposer les résultats obtenus au cours de nos recherches, nous présentons un exposé bibliographique, articulé sur trois chapitres, traitant : (1) de la structure, des fonctions et du métabolisme des glycannes des glycoprotéines, chez les mammifères ; (2) des pathologies métaboliques des glycoprotéines humaines ; et (3) des différentes approches de glycomique, employées pour l'étude structurale de la glycosylation des glycoprotéines.

# **EXPOSE BIBLIOGRAPHIQUE**

## CHAPITRE I :

### LA GLYCOSYLATION DES PROTEINES

A-Introduction	3
B-Les monosaccharides composant les glycoprotéines	4
C-Les différents types de glycosylation	5
1-La N-glycosylation	5
2-La O-glycosylation	5
3-La C-glycosylation	9
D-Structures des chaînes glycanniques des glycoprotéines	10
1-Structure des N-glycannes	10
2-Structure des O-glycannes de type mucine	13
E-Fonctions des glycoprotéines	15
1-Modulation des propriétés physicochimiques des glycoprotéines	16
1.1-Influence des glycannes sur la solubilité et la stabilité des glycoprotéines	16
1.2-Influence des glycannes sur le repliement et l'oligomérisation des glycoprotéines	17
1.3-Influence des glycannes sur la résistance vis-à-vis des protéases	18
2-Modulation des propriétés biologiques et immunologiques des glycoprotéines	18
2.1-Influence des glycannes sur les activités enzymatiques des glycoprotéines	18
2.2-Influence des glycannes sur les activités de signalisation des glycoprotéines	19
2.3-Influence des glycannes sur les propriétés immunologiques des glycoprotéines	19
2.4-Influence des glycannes sur la clairance des glycoprotéines circulantes	20
3-Modulation des processus biologiques par les glycannes des glycoprotéines	21
F-Métabolisme des glycoprotéines	23
1-Biosynthèse des glycoprotéines	23
1.1-Généralités sur la biosynthèse des glycoprotéines	23
1.2-Métabolisme des nucléotide-sucres.	25
1.3-Biosynthèse des N-glycannes	27
1.3.1-Initiation de la N-glycosylation au niveau du RE	27
1.3.1.1-Assemblage du précurseur tétradécasaccharidique	27
1.3.1.2-Transfert du précurseur tétradécasaccharidique	28
1.3.1.3-Contrôle-qualité des N-glycosylprotéines néosynthétisées	29
1.3.2-Maturation des N-glycannes au niveau de l'appareil de Golgi	31
1.3.2.1-Formation du signal d'adressage des enzymes lysosomaux	31
1.3.2.2-Biosynthèse des N-glycannes de type complexe et de type hybride	33
1.3.3-Biosynthèse des O-glycannes	36
2-Catabolisme des glycoprotéines	39
2.1-Catabolisme cytoplasmique des glycoprotéines	39
2.2-Catabolisme lysosomal des glycoprotéines	41
2.2.1-Généralités sur le catabolisme lysosomal des glycoprotéines	41
2.2.2-Transport des glycoprotéines vers le lysosome	41
2.2.3-Catabolisme lysosomal des glycoprotéines	43
2.2.3.1-Protéolyse	43
2.2.3.2-Dégradation des N-glycosylprotéines	43
2.2.3.3-Dégradation des O-glycosylprotéines	46

#### **A-Introduction**

Les glycoprotéines constituent une classe importante de biomolécules ubiquitaires, qu'elles soient cellulaires ou secrétées, et sont très largement répandues dans tout le règne du vivant, des virus aux mammifères. Chez les eucaryotes, la glycosylation des protéines constitue la modification post-traductionnelle la plus importante et la plus complexe, comme en témoigne la part du génome consacrée aux processus de glycosylation, plus de 1% (Lowe & Marth, 2003). De plus, l'analyse des banques de données protéiques (SWISS-PROT) montre que plus de 50% des protéines sont glycosylées et, que probablement plus de 80% des protéines membranaires seraient glycosylées (Apweiler *et al.*, 1999).

Ces biomolécules résultent de l'association covalente par une liaison glycosidique d'un mono-/oligosaccharide, appelé copule glucidique ou glycanne, avec une protéine. Une même glycoprotéine peut présenter plusieurs sites de liaison à un glycanne, appelés site de glycosylation. La structure de la copule glucidique peut être divisée en trois parties : « le noyau », région proximale invariante, conservée et liée à l'aglycone protéique, substituée par une ou plusieurs « antennes », constituant le squelette de base, lesquelles pouvant à leur tour être substituées par différents « sucres périphériques », bien souvent responsables des propriétés biologiques des glycannes. Alors que la séquence primaire des protéines est codée sur une matrice d'acide désoxyribonucléique (ADN), la séquence primaire des chaînes glycanniques des glycoprotéines n'est codée sur aucune matrice, mais résulte de l'action concertée de plusieurs enzymes, les glycosyltransférases (Taniguchi et al., 2002). Tandis que les protéines et les acides nucléiques sont respectivement caractérisés par des enchaînements linéaires en monomères d'acides aminés et de nucléotides, les chaînes glycanniques, quant à elles, se caractérisent par des structures branchées. Les possibilités de liaisons contractées entre les monomères saccharidiques sont bien plus importantes que celles contractées entre les monomères de nucléotides (ADN) et d'acides aminés, si l'on considère le type d'anomérie (a et  $\beta$ ), la position de la fonction hydroxyle impliquée dans la liaison et le nombre de points de branchement. Ainsi, alors que six acides aminés différents conduisent à 10<sup>5</sup> structures, six hexoses différents conduisent à 10<sup>12</sup> structures (Laine, 1994).

Une glycoprotéine peut se présenter sous de multiples glycoformes, possédant, toutes, la même séquence protéique mais différant par : (1) le nombre et la nature des sites glycosylés; (2) le nombre et la structure des chaînes glycanniques; et (3) la distribution des chaînes glycanniques sur chaque site de glycosylation (Rademacher *et al.*, 1988).

Les chaînes glycanniques sont capables de moduler les propriétés physicochimiques (stabilité, solubilité, oligomérisation) et immunologiques, et la clairance des glycoprotéines. De plus, la complexité et la variabilité des glycannes sont à l'origine de leur potentiel à coder divers signaux de reconnaissance moléculaire spécifiques, au cours d'un certain nombre de processus biologiques, comme l'inflammation, l'immunité, la reproduction et l'embryogénèse (Varki, 1993, 1999). Les progrès réalisés dans la compréhension de ces processus biologiques expliquent l'intérêt grandissant des biologistes pour l'étude de la structure des glycannes des glycoprotéines et de leurs implications biologiques.

#### B- Les monosaccharides composant les glycoprotéines

Malgré le très grand nombre de monosaccharides existant dans la nature, une dizaine seulement est utilisée pour l'assemblage des glycoprotéines chez les mammifères (Fig. 1). Ces monosaccharides ont plusieurs origines : l'alimentation, le métabolisme endogène (réactions d'interconversions, glycolyse...) et le catabolisme lysosomal des glycoprotéines et glycolipides. Parmi ces monosaccharides, on retrouve essentiellement des oses neutres (galactose, glucose, mannose, fucose, et xylose), des osamines (glucosamine, Nacétylglucosamine, N-acétylgalactosamine), et des acides sialiques (acide Nacétylneuraminique, acide N-glycolylneuraminique). De plus, ces monosaccharides peuvent être modifiés par phosphorylation, sulfatation, méthylation, acétylation, dans le cadre des « modifications post-synthétiques » des glycannes des glycoprotéines, accroissant de fait l'hétérogénéité glycannique, décrite précédemment (Yu & Chen, 2007).



Figure 1 : Structure des monosaccharides majeurs constituant les chaînes glycanniques des glycoprotéines.

#### C-Les différents types de glycosylation

#### 1- La N-glycosylation

La N-glycosylation est une modification cotraductionnelle majeure des protéines dans les cellules eucaryotes. Elle concerne une large variété de glycoprotéines, retrouvées dans le milieu extracellulaire et les secrétions épithéliales exocrines et endocrines (plasma sanguin et autres fluides biologiques), mais également au niveau de la membrane plasmique, du réticulum endoplasmique (RE), de l'appareil de Golgi, de la membrane nucléaire externe et des lysosomes. La liaison sucre-protéine est de type N-β-glycosylamine impliquant la fonction hémi-acétalique d'un résidu de GlcNAc et la fonction amide d'un résidu d'asparagine (Asn). Le site de N-glycosylation est localisé au niveau de la séquence consensus « Asn-Xxx-Ser/Thr » (Xxx étant n'importe quel résidu d'acide aminé sauf la proline), également appelée le séquon (Kornfeld & Kornfeld, 1985, Gavel & von Heijne, 1990). Cependant, la présence de ce tripeptide est une condition nécessaire, mais pas suffisante, pour qu'un résidu d'Asn soit N-glycosylé, si bien qu'un site peut présenter une hétérogénéité d'occupation, appelée « macrohétérogénéité glycannique » (Aubert et al., 1981; Gavel & von Heijne, 1990 ; Jones et al., 2005). Une étude comparative de glycoprotéines bien caractérisées dans les banques de données SWISS-PROT et de glycoprotéines dans les banques de données cristallographiques PDB a indiqué que le taux d'occupation des sites est d'environ 2/3 (Apweiler, 1999 ; Petrescu et al., 2004). De plus, des travaux ont montré que la N-glycosylation peut être réalisée au niveau de sites atypiques tels que le type « Asn-Xxx-Cys », retrouvé sur la transferrine humaine (Satomi et al., 2004), ou encore le type « Asn-Gly-Gly-Thr », présent sur la chaîne lourde µ d'une immunoglobuline M de souris (Kehry et al., 1979).

#### 2- La O-glycosylation

La O-glycosylation est une modification exclusivement post-traductionnelle chez laquelle la liaison protéine-sucre, de type acétalique, résulte de la condensation de la fonction hémiacétalique d'un monosaccharide avec la fonction alcool d'un acide aminé hydroxylé. Chez les mammifères, on compte essentiellement sept types de O-glycosylation (Tableau 1).

	Liaison peptide/sucre	Glycoprotéines
N-GlcNAc	(NeuAc, Fuc, Gal, GlcNAc, Man) <b>GlcNAc</b> (β1-N)Asn-Xxx- Ser/Thr	50% des glycoprotéines totales 80% des glycoprotéines membranaires
O-GalNAc	(NeuAc, Gal, GlcNAc)GalNAc(α1-O)Ser/Thr	Mucines membranaires et des secrétions épithéliales exocrines La plupart des glyco- protéines membranaires Glycoprotéines circulantes
O-GlcNAc	<b>GlcNAc</b> (β1-O)Ser/Thr	Protéines cytosoliques et nucléaires
O-Gal	+/- Glc(α1-2)Gal(β1-O)Ser/Thr	Collagènes
O-Xyl	[HexUA-HexNAc] <sub>n</sub> -GlcUA-Gal-Gal- <b>Xyl</b> (β1-O)Ser/Thr	Protéoglycannes matriciels, membranaires & circulants
O-Man	$\label{eq:solution} \begin{split} & \text{NeuAc}(\alpha 2\text{-}3)\text{Gal}(\beta 1\text{-}4)\text{GlcNAc}(\beta 1\text{-}2)\textbf{Man}(\alpha 1\text{-}O)\text{Ser/Thr}\\ & \text{SO}_3^-(3)\text{GlcUA}(\beta 1\text{-}3)\text{Gal}(\beta 1\text{-}4)\text{GlcNAc}(\beta 1\text{-}2)\textbf{Man}(\alpha 1\text{-}O)\text{Ser/Thr}\\ & \textbf{Man}(\alpha 1\text{-}O)\text{Ser/Thr} \end{split}$	Glycoprotéines musculaires Glycoprotéines cérébrales IgG 2 (Chaîne légère)
O-Fuc	+/- [NeuAc(α2-3/6)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)]Fuc(α1-O)Ser/Thr Glc(β1-3)Fuc(α1-O)Ser/Thr	Domaines EGF/ Domaines TSR des - facteurs de coagulation - Récepteurs Notch
O-Glc	+/- Xyl(α1-3) +/- Xyl(α1-3) +/- <b>Glc</b> (β1-O)Ser/Thr	Domaines EGF des - facteurs de coagulation - Récepteurs Notch
	$[Glc(\alpha 1-4)]_n Glc(\alpha 1-O)Tyr$	Glycogénine
C-Man	<b>Man(α1-C)</b> Trp-Xxx-Trp	RNase 2, IL-12 Domaines TSR de quelques protéines comme certains facteurs du complément et la thrombospondine 1

#### Tableau 1 : Les différents types de glycosylation des protéines de mammifères

-Le type mucine (O-GalNAc). C'est le plus répandu. La O-glycosylation de type mucine implique l'association d'un résidu de GalNAc à un résidu de Ser/Thr par le biais d'une liaison O- $\alpha$ -glycosidique. Elle est retrouvée chez de nombreuses glycoprotéines, qu'elles soient membranaires ou circulantes, mais surtout chez un groupe de glycoprotéines de haute masse moléculaire produites au niveau des secrétions épithéliales exocrines : les mucines (van den Steen *et al.*, 1998 ; Brockhausen, 1999).

-Le type O-GlcNAc. Egalement ubiquitaire, ce type de O-glycosylation met en jeu une liaison de type O- $\beta$ -glycosidique, entre un résidu de GlcNAc et un résidu de Ser/Thr, essentiellement au niveau des protéines cytosoliques et nucléaires. C'est une modification particulière puisque, d'une part, la copule glucidique n'est constituée que d'un monosaccharide, la GlcNAc, et, d'autre part, la liaison O-glycosidique est transitoire, réversible, si bien que la O-N-acétylglucosaminylation est en équilibre avec les processus de phosphorylation (Hart *et al.*, 2007).

-Le type protéoglycanne (O-Xyl). Ce type de O-glycosylation est caractérisé par l'association covalente de très longs polysaccharides polychargés linéaires, les glycosaminoglycannes (GAG), avec l'axe peptidique d'une classe particulière de Oglycosylprotéines de très haute masse moléculaire, les protéoglycannes, composants essentiels de la matrice extracellulaire et de la lame basale de la plupart des tissus conjonctifs (Bülow & Hobert, 2006). Cette association implique une liaison O-β-glycosidique entre un résidu de Xyl et un résidu de Ser. Les chaînes de GAG sont constituées d'un noyau tétrasaccharidique linéaire conservée GlcUA( $\beta$ 1–3)Gal( $\beta$ 1–3)Gal( $\beta$ 1–4)Xyl( $\beta$ 1-O)Ser, prolongé par un nombre variable d'unités disaccharidiques linéaires HexUA-HexNH-R (R = H/Ac), sulfatées ou non. En fonction de la nature des résidus saccharidiques et de l'isomérie des liaisons interglycosidiques des unités disaccharidiques répétitives, on définit quatre familles de GAG : les chondroïtine-sulfates, les dermatane-sulfates, l'héparine/les héparane-sulfates et les kératane-sulfates. Cependant, seules les trois premières familles de GAG possèdent des chaînes de O-xylosyl-GAG, à proprement parler, tandis que les chaînes de kératane-sulfates sont liés à l'axe protéique via un N-glycanne ou un O-glycanne de type O-GalNAc ou de type O-Man. Les chaînes de GAG confèrent aux protéoglycannes de nombreuses propriétés biologiques, telles que la régulation des activités enzymatiques, la régulation de la croissance cellulaire et le contrôle de l'assemblage et de la fonction des matrices extracellulaires.

-Le type collagène (O-Gal). Il est uniquement retrouvé au niveau de glycoprotéines fibreuses, les collagènes, constituants essentiels de la matrice extracellulaire de la plupart des tissus conjonctifs. Ce type de O-glycosylation résulte de l'association covalente, par une liaison O- $\beta$ -glycosidique, d'un résidu de Gal avec un résidu d'acide aminé particulier, l'hydroxylysine (hLys). Cet acide aminé est formé de manière post-traductionnelle, par action de la lysyl hydroxylase sur les molécules de précollagène. La copule glucidique est constitué soit de Gal seul, soit du disaccharide Glc( $\alpha$ 1-2)Gal (Spiro, 1973).

-Le type O-Man. Cette forme de O-glycosylation est retrouvée dans un nombre limité de glycoprotéines du système nerveux (Chai *et al.*, 1999), du muscle squelettique de mammifères, comme l' $\alpha$ -dystroglycanne (Endo, 2004) et du plasma sanguin, comme l'IgG 2, chez laquelle la copule glucidique est réduite au résidu de Man (Martinez *et al.*, 2007). La O-mannosylation résulte de l'association covalente par une liaison O- $\alpha$ -glycosidique d'un résidu de Man avec un résidu de Ser/Thr.

-Le type O-Fuc. La O-glycosylation de type O-Fuc est localisée au niveau des domaines répétés EGF (epidermal growth factor) (Harris & Spellman, 1993) et TSR (thrombospondine 1-repeats) (Shao & Haltiwanger, 2003) de quelques glycoprotéines fibrinolytiques, comme l'activateur du plasminogène tissulaire (Harris *et al.*, 1991) ou encore les facteurs de coagulation VII (Kao *et al.*, 1999) et XII (Harris *et al.*, 1992), et de certains récepteurs membranaires ubiquitaires de la famille Notch, impliqués dans des processus développementaux majeurs chez les mammifères, comme la myogénèse (Rampal *et al.*, 2007). La O-Fuc résulte d'une liaison O- $\alpha$ -glycosidique entre un résidu de Fuc et un résidu de Ser/Thr.

-Le type O-Glc. La O-glycosylation de type O-Glc est également retrouvé au niveau des domaines répétés EGF de glycoprotéines fibrinolytiques (Shao *et al.*, 2002), comme les facteurs VII (Bjoern *et al.*, 1991) et IX (Reimer, 1993), de glycoprotéines impliquées dans des processus développementaux, comme le récepteur Notch 1 (Molonay *et al.*, 2000), ou encore de la protéine Z humaine, impliquée dans la fécondation (Nishimura *et al.*, 1989). Dans le cas des glycoprotéines précédemment citées, ce type de glycosylation met en jeu une liaison O- $\beta$ -glycosidique entre un résidu de Glc et un résidu de Ser/Thr. Cependant, la O-glucosylation est également retrouvée chez une protéine participant à la biosynthèse du glycogène, la glycogénine, où la liaison protéine-sucre, de type O- $\alpha$ -glycosidique, résulte de l'association covalente d'un résidu de Glc avec un résidu de tyrosine (Tyr).

Contrairement à la N-glycosylation, il n'existe aucune séquence consensus stricte pour la plupart de ces types de O-glycosylation, exceptions faites de la O-glycosylation de type O-Glc et de type O-Fuc (Shao *et al.*, 2002 ; Shao & Haltiwanger, 2003). Concernant le type mucine, qui nous intéresse plus particulièrement dans ce manuscrit, de nombreuses études statistiques ont néanmoins montré d'importantes homologies dans la composition en acides aminés, autour de la position des sites de O-glycosylation d'un certain nombre de O-glycosylprotéines bien connues (Hansen *et al.*, 1998 ; Thanka Christlet & Veluraja, 2001).

L'absence de sites consensus peut notamment s'expliquer par la coexistence de multiples transférases, catalysant la même réaction de O-glycosylation, bien qu'elles possèdent, pour la plupart, des spécificités distinctes pour le substrat protéique. Un bon exemple est celui de la O-glycosylation de type mucine, initiée par pas moins d'une quinzaine de UDP-GalNAc : polypeptide α-GalNAc transférases (T) ou pp-GalNAc T, dont l'expression est tissuspécifique (Ten Hagen *et al.*, 2003). Enfin, toutes les études statistiques ont conduit à l'élaboration d'algorithmes dédiés à la prédiction des sites de O-glycosylation de type mucine. C'est le cas du serveur de prédiction NetOglyc 3.1, capable de prédire 76% des résidus O-glycosylés et 93% des résidus non O-glycosylés, quelles que soient les protéines testées (Julenius *et al.*, 2005). NetOglyc 3.1 est disponible sur internet à l'adresse suivante : www.cbs.dtu.dk/services/netoglyc.

#### 3- La C-glycosylation

La C-glycosylation est une modification post-traductionnelle qui résulte de l'association covalente d'un résidu de mannose avec un résidu de tryptophane (Trp) par le biais d'une liaison « carbone-carbone » entre l'atome de carbone en position 1 du résidu de Man et l'atome de carbone en position 2 du noyau indole du résidu de Trp (Hofsteenge *et al.*, 1994 ; de Beer *et al.*, 1995). La liaison protéine-sucre n'est pas une liaison glycosidique à proprement parler et la copule glucidique est réduite au résidu d'a-Man. Des expériences de mutagénèse dirigée ont pu montrer que la séquence consensus de C-mannosylation est de type « Trp-Xxx-Xxx-Trp » (Xxx étant n'importe quel acide aminé), le résidu de Trp N-terminal étant celui engagé dans la liaison avec le résidu de Man (Krieg *et al.*, 1997). Cependant, la nature des résidus Xxx reste inconnue à l'heure actuelle. La C-mannosylation intéresse un nombre limité de glycoprotéines, comme la RNase 2 (Hofsteenge *et al.*, 1994), l'interleukine 12 (IL-12) (Doucey *et al.*, 1999) et d'autres glycoprotéines possédant notamment des domaines répétés de type TSR, comme la thrombospondine de type 1, qui est également O-fucosylée (Hofsteenge *et al.*, 2001) et certains facteurs du complément (Hofsteenge *et al.*, 1999).

#### D- Structures des chaînes glycanniques des glycoprotéines

#### 1- Structure des N-glycannes

Les N-glycannes sont caractérisés par un noyau pentasaccharidique commun, le noyau trimannosyl-N,N'-diacétylchitobiose (Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub>), conservé quel que soit l'espèce (Fig. 2). Ce noyau est caractérisé par la présence d'un point de branchement au niveau d'un résidu de  $\beta$ -Man, donnant naissance à deux branches : les branches ( $\alpha$ 1-3)- et ( $\alpha$ 1-6)-mannosidique. En fonction de la nature des antennes qui substituent ce noyau au niveau de chacune de ces branches mannosidiques, les N-glycannes sont subdivisés en trois groupes : le type complexe, le type oligomannosidique et le type hybride (Kornfeld & Kornfeld, 1985).

Les N-glycannes de type complexe ne renferment que trois résidus de Man, ceux du noyau pentasaccharidique, et possèdent des antennes constituées par deux à quatre résidus de GlcNAc, pour respectivement donner des structures dites bi-, tri(')- et tétraanténnées (Fig. 2). Le résidu de  $\beta$ -Man du noyau pentasaccharidique peut également être substitué par un résidu de GlcNAc, dit intercalaire, mais ne constitue pas une antenne.

Les résidus de GlcNAc antennaires peuvent être substitués en positions 3 ou 4 par des résidus de Gal, pour former des chaînes N-acétyllactosaminiques ou LacNAc Gal(B1-3/4)GlcNAc-R de type 1 ou de type 2, respectivement. Chez l'homme, l'expression des chaînes LacNAc de type 1 est mineure et restreinte aux tissus épithéliaux, tandis que les chaînes LacNAc de type 2 sont ubiquitaires. Les résidus de GlcNAc antennaires peuvent également être substitués en position 4 par des résidus de GalNAc, pour former des chaînes N,N'-diacétyllactosaminiques ou LacdiNAc GalNAc(β1-4)GlcNAc-R (van den Eijinden et al., 1997). Dans certains cas, sur les N-glycannes multiantennés, l'antenne LacNAc de type 2 branchée en (β1-6) sur la branche (α1-6)-mannosidique peut être prolongée par des unités polylactosaminiques linéaires (polyLacNAc) liées entre elles par une liaison en (β1-3) (Fig. 3). L'unité LacNAc répétée est essentiellement de type 2. La séquence polyLacNAc de type 2 linéaire forme l'antigène i. Cette séquence polyLacNAc peut être branchée et, dans ce cas, un ou plusieurs résidus de Gal internes sont substitués en (\beta1-6) par un résidu de GlcNAc ou par une ou plusieurs unités LacNAc de type 2, pour former l'antigène I. Bien que n'étant formées que par des unités LacNAc de type 2, les antennes polyLacNAc (i/I) peuvent être terminées par une unité LacNAc de type 1, voire, plus rarement, par une unité LacdiNAc. Les résidus de Gal distaux des antennes LacNAc sont souvent substitués en ( $\alpha$ 2-3/6) par des résidus de NeuAc, ou, plus rarement, par des acides polysialiques [NeuAc( $\alpha 2$ -8)]<sub>8-12</sub>, comme c'est le cas pour les molécules d'adhésion du système nerveux (N-CAM) (Finne, 1982). La sialylation est plus fréquente en ( $\alpha 2$ -3), compte tenu des multiples activités ( $\alpha 2$ -3)-sialyltransférasiques (ST3-Gal) ubiquitaires ; tandis que la sialylation en ( $\alpha 2$ -6), est moins fréquente, les enzymes en charge de cette synthèse (ST6-Gal I et II) n'étant exprimés que chez de rares types cellulaires, comme le foie et la glande mammaire, où ils constituent les principales sialyltransférases. Chez certains mammifères, comme le bovin et les rongeurs, les résidus de GlcNAc antennaires terminaux (antennes de type 1) peuvent être sialylés en ( $\alpha 2$ -6).



Figure 2 : Structure du noyau pentasaccharidique et des différentes classes de N-glycannes.

Par ailleurs, chez certaines espèces, comme le porc, une galactosylation terminale en  $(\alpha 1-3)$ des chaînes LacNAc de type 2 peut remplacer la sialylation en ( $\alpha$ 2-3) et forme le xénoantigène de Galili, qui est à l'origine des phénomènes de rejets observés au cours d'expériences de xénogreffes chez l'homme (Galili, 1989, 2006). Le résidu de GalNAc des chaînes LacdiNAc peut être sialylé en ( $\alpha$ 2-6) ou substitué en position 4 par un résidu de sulfate, comme c'est le cas de bon nombre de glycohormones de l'axe hypothalamohyphophyso-gonadique, telles que la «thyrotrophin-stimulating hormone» (TSH) ou encore la « follicle-stimulating hormone » (FSH) (Baenziger & Green, 1988). La sulfatation des antennes de type 1 et de type 2, en revanche, peut être réalisée soit en positions 3/4/6 des résidus de GlcNAc internes et subterminaux, soit en positions 3/6 des résidus de Gal distaux, soit, plus rarement, sur en position 3 du résidu de GlcNAc proximal. Enfin, les antennes LacNAc peuvent respectivement être substituées en ( $\alpha$ 1-2) et ( $\alpha$ 1-3/4) sur des résidus de Gal distaux et de GlcNAc internes ou subterminaux, par des résidus de Fuc, pour former les déterminants antigéniques à activités de groupe sanguin de type Lewis (Le) et de type ABH (Fig. 3) (Marionneau et al., 2001; Orczyk-Pawilowicz, 2007). Par ailleurs, la fucosylation peut également avoir lieu ( $\alpha$ 1-6) sur le résidu de GlcNAc proximal.

Les N-glycannes de type oligomannosidique possèdent des antennes exclusivement constituées de résidus d' $\alpha$ -Man et peuvent renfermer de quatre à neuf résidus de Man (Man<sub>4</sub>GlcNAc<sub>2</sub> à Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub> ou Man<sub>4-9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>).

Enfin, les N-glycannes de type hybride possèdent des séquences oligomannosidiques, au niveau de la branche ( $\alpha$ 1-6)-mannosidique, et des séquences complexes, au niveau de la branche ( $\alpha$ 1-3)-mannosidique (Fig. 2). Ces structures présentent fréquemment un résidu de GlcNAc intercalaire et peuvent être fucosylées en ( $\alpha$ 1-6) sur le résidu de GlcNAc proximal. La composante oligomannosidique peut être formée de un à quatre résidus de Man. La composante complexe peut être constituée d'une ou deux antenne(s) formée(s) d'une unité LacNAc de type 2 ou LacdiNAc, pouvant être sialylée ou sulfatée. Des déterminants antigéniques à activités de groupe sanguin de types ABH et Le peuvent être présents au niveau de l'extrémité distale des glycannes de type hybride.



#### Figure 3 : Structure des principaux motifs antigéniques communs aux N-/O-glycannes.

#### 2- Structure des O-glycannes de type mucine

A la différence des N-glycannes, les O-glycannes sont caractérisés par l'existence de huit noyaux (Fig. 4) (van den Steen et al., 1998; Brockhausen, 1999). Les noyaux 1 à 4 ont une occurrence plus importante que celle des noyaux 5 à 8. Chez la plupart des mammifères, le noyau 1, qui constitue le déterminant antigénique de Thomsen-Friedenreich, dit antigène T, et le noyau 2 ont une distribution ubiquitaire et entrent aussi bien dans la composition des mucines que celle d'autres types de glycoprotéines, qu'elles soient membranaires ou secrétées (plasma sanguin). Le noyau 7 est le seul qui n'ait jamais été décrit chez l'homme. Les noyaux 3 à 8, quant à eux, sont exclusivement retrouvés au niveau des mucines des tractus gastrointestinal, respiratoire et reproductif. Hormis ces huit noyaux, l'antigène Tn GalNAc( $\alpha$ 1-O)Ser/Thr et sa forme sialylée, l'antigène sialyl-Tn NeuAc( $\alpha$ 2-6)GalNAc( $\alpha$ 1-O)Ser/Thr, peuvent être retrouvées à la surface de certaines glycoprotéines et mucines (Fig. 5). Le noyau 1 ou antigène T est essentiellement retrouvé sous forme monosialylée NeuAc( $\alpha$ 2-3/6)Gal( $\beta$ 1-3)GalNAc-R ou bisialylée NeuAc( $\alpha$ 2-6)[NeuAc( $\alpha$ 2-3)Gal( $\beta$ 1-3)]GalNAc-R (Fig. 5). Le noyau 3 peut également être sialylé en ( $\alpha$ 2-6).



Figure 4 : Structure des huit noyaux O-glycanniques.

De plus, comparés aux N-glycannes de type complexe, avec lesquels ils partagent la quasitotalité des caractéristiques structurales, les O-glycannes se caractérisent par une incroyable hétérogénéité. En effet, comme pour le noyau pentasaccharidique, chacun des noyaux peut être substitué par divers motifs saccharidiques (GlcNAc et Gal) pour former des antennes LacNAc de type 1 et de type 2, fréquemment sialylées en ( $\alpha$ 2-3). Comme pour les Nglycannes de type complexe, ces antennes peuvent également être galactosylées en ( $\alpha$ 1-3). Les chaînes LacdiNAc sont absentes des O-glycannes. La figure 5 montre les nombreuses possibilités de structures pouvant être formées à partir des noyaux 1 à 4, les plus couramment rencontrés. Les antigènes i/I peuvent prendre naissance au niveau des noyaux 2 et 4, qui, comme les N-glycannes tri'- et tétraantennés, présentent une branche ( $\beta$ 1-6)-N-acétylglucosaminyl, favorable à la formation de séquences polyLacNAc. Les déterminants antigéniques à activités de groupe sanguin ABH, Sda/Cad et Le peuvent également être formés à partir d'antennes de type 1 et de type 2, et d'antennes polyLacNAc linéaires ou branchées (i/I).



## Figure 5 : Structures composites illustrant la diversité des séquences portées par les noyaux O-glycanniques de type 1 à 4.

#### E- Fonctions des glycannes des glycoprotéines

Plus de 50% des protéines de mammifères sont glycosylées (Apweiler *et al.*, 1999). L'importance de la glycosylation a été démontrée au cours de nombreuses études réalisées sur des lignées cellulaires mutantes de levures et de mammifères, ou encore sur des modèles de souris « knock-out » (KO), porteuses d'erreurs métaboliques de la glycosylation (Schachter, 2001 ; Lowe & Marth, 2003 ; Vogt *et al.*, 2007). Par exemple, l'invalidation du gêne *Mgat I*, codant pour la GlcNAc T I, un enzyme clé de la biosynthèse des N-glycannes de type complexe et de type hybride, chez des souris, entraîne la mort des embryons au bout de neuf jours, causée par des anomalies de vascularisation et de fermeture du tube neural (Ioffe & Stanley, 1994). L'invalidation génique de la GlcNAc T II, également impliquée dans la maturation des N-glycannes, chez des souris entraîne la mort de près de 100% des souriceaux une semaine après leur naissance (Wang et al., 2001). Par ailleurs, de nombreuses études, basées sur l'utilisation de modèles de souris KO ou encore sur des expériences de mutagénèse dirigée contre les sites de N-glycosylation de glycoprotéines particulières, ont montré que les glycannes des glycoprotéines peuvent moduler : (1) leurs propriétés physicochimiques, comme le repliement, la solubilité, la stabilité, l'oligomérisation et leur résistance vis-à-vis des protéases (Lis & Sharon, 1993; Mitra et al., 2006); (2) leurs propriétés biologiques, grâce à leurs propriétés d'interagir avec les lectines (Sharon & Lis, 2004) et de moduler les interactions moléculaires par leur encombrement stérique; et (3) leurs propriétés antigéniques. Enfin, de part de leur complexité et leur hétérogénéité, les glycannes constituent des signaux de reconnaissance spécifiques, dans les phénomènes d'adhésion et de communication cellulaire, mises en jeu au cours de l'inflammation, l'immunité, la reproduction et l'embryogénèse (Varki, 1993, 1999 ; Taylor & Drickamer, 2003 ; Ohtsubo & Marth, 2006).

#### 1- Modulation des propriétés physicochimiques des glycoprotéines

#### 1.1- Influence des glycannes sur la solubilité et la stabilité des glycoprotéines

Du fait du caractère hydrophile des glycannes, ils contribuent à augmenter la solubilité des protéines qui les portent, et, donc, à prévenir leur aggrégation. Par exemple, la déglycosylation de l'érythropoïétine (EPO) a pour effet de diminuer significativement sa solubilité (Dordal *et al.*, 1985). Les glycannes permettent également d'augmenter la résistance à la dénaturation thermique en contractant des liaisons hydrogène avec certains résidus d'acides aminés polaires de la chaîne peptidique, et/ou certains résidus saccharidiques des glycannes voisins, ce qui a pour effet de rigidifier la structure protéique. C'est le cas de la LAMAN bovine, dont la structure tridimensionnelle a été élucidée par cristallographie par diffraction de rayons X (Heikinheimo *et al.*, 2003). On a pu montrer que les N-glycannes, positionnés au niveau du résidu de Asn<sup>497</sup>, est dirigé contre un groupe d'hélices  $\alpha$ , avec lesquelles ils contractent des liaisons hydrogène, ce qui a pour effet de diminuer localement la flexibilité de la chaîne peptidique et, donc, de rigidifier la structure protéique. Une autre étude, menée par Arnold & Ulbrich-Hoffmann (2000), sur la ribonucléase (RNase)
pancréatique bovine, soumise à des expériences de dénaturation thermique ou chimique en présence de 6 M de chlorhydrate de guanidine, a révélé que la RNase B était plus stable que sa forme non glycosylée, la RNase A.

#### 1.2- Influence des glycannes sur le repliement et l'oligomérisation des glycoprotéines

De nombreuses études ont montré que les glycannes aident au repliement de la chaîne protéique, en agissant comme molécules chaperonnes. En effet, des expériences de dépliement / repliement in vitro, réalisées sur un certain nombre de glycoprotéines, ont révélé que le taux de protéines glycosylées repliées est, de loin, plus important que celui de leurs formes non glycosylées (Adar *et al.*, 1997). Au cours du mécanisme de repliement protéique, les formes non glycosylées s'aggrègent au niveau de leurs surfaces hydrophobes, exposées en surface. Quant aux protéines glycosylées, les glycannes contracteraient des liaisons hydrogène avec la chaîne protéique, et aideraient, de fait, au repliement de la chaîne protéique, en stabilisant certaines structures secondaires.

Les glycannes peuvent également influencer l'oligomérisation des glycoprotéines. Par exemple, une étude menée sur la quercétine 2,3-dioxygénase, une N-glycosylprotéine dimérique isolée d'Aspergillus japonicus, par une déglycosylation enzymatique suivie de la caractérisation des sites de glycosylation, a montré que quatre des cinq sites de Nglycosylation étaient déglycosylés, en raison du positionnement du glycanne lié au cinquième site au niveau de l'interface dimérique (Fusetti et al., 2002). Les glycannes positionnés au niveau d'une sous-unité contractent des liaisons hydrogène avec les structures secondaires de la sous-unité controlatérale, et stabiliseraient ainsi le dimère. Une autre étude est celle du rôle de la glycosylation dans la formation de fibrilles de protéine du prion (PrP<sup>c</sup>), qui, sous forme de fibrilles, constitue l'agent pathogène infectieux au cours d'encéphalopathies spongiformes, affectant l'homme et certains animaux (Prusiner, 1994 ; Bosques & Imperiali, 2003). Les auteurs ont pu montrer que la glycosylation du résidu d'Asn<sup>81</sup> de la protéine PrP<sup>c</sup> a pour effet de stimuler et de stabiliser la formation d'un pont disulfure intrachaîne (Cys<sup>179</sup>-Cys<sup>214</sup>), empêchant ainsi la formation de fibrilles, en masquant les surfaces protéiques nécessaires à l'association des molécules de PrP<sup>c</sup>. De plus, les glycannes empêcheraient l'association des molécules de PrP<sup>c</sup> par leur encombrement stérique (Rudd et al., 2002).

#### 1.3- Influence des glycannes sur la résistance vis-à-vis des protéases

Les glycannes jouent un rôle important dans la protection des glycoprotéines contre les attaques de protéases. Wang & Hirs (1977) ont montré que la RNase pancréatique porcine était beaucoup plus sensible aux activités protéolytiques de la trypsine et de la subtilysine, une fois N-déglycosylée. Les glycannes protègent généralement les glycoprotéines en masquant les sites potentiels de clivage par les protéases exposés à la surface (Yet & Wold, 1990).

#### 2- Modulation des propriétés biologiques et immunologiques des glycoprotéines

#### 2.1- Influence des glycannes sur les activités enzymatiques des glycoprotéines

Les glycannes peuvent moduler de manière variable et contrastée l'activité biologique des glycoprotéines, suivant leur configuration structurale par rapport aux sites protéiques impliqués dans la fonction biologique. Par exemple, les diverses liaisons hydrogène et/ou électrostatiques pouvant être contractées entre les glycannes et les structures secondaires de la chaîne protéique ont pour conséquences de stabiliser localement la conformation protéique et, de fait, de maintenir la structure dans sa configuration active. La mutagénèse dirigée contre les sites de N-glycosylation de la FUT IV (Baboval et al., 2000) et de la (\beta1-4)-GalNAc T (Haraguchi et al., 1995), a pour conséquence une diminution jusqu'à 95% de leur activité catalytique. Un autre exemple est celui du facteur de coagulation IX, dont la désialylation conduit à une perte totale d'activité (Chavin & Weidner, 1984). A l'inverse, la présence de glycannes peut diminuer l'affinité d'un enzyme pour son substrat par effet stérique. C'est le cas de l'activateur du plasminogène tissulaire, enzyme impliqué dans la conversion du plasminogène en plasmine qui induit la fibrinolyse, dont la désialylation ou la déglycosylation partielle conduit à une augmentation significative de son activité enzymatique (Wilhelm et al., 1990). Toutes les études réalisées à ce sujet, tendent à montrer que, d'une manière générale, les N-glycannes modulent négativement l'activité des enzymes et, notamment, leur affinité pour leurs substrats, et que les O-glycannes (type mucine), à l'inverse, influent positivement sur l'activité de ces derniers, en augmentant leur vélocité et leur affinité pour leurs substrats (van den Steen et al., 1998). Les N-glycannes, dans ce cadre, ont, en règle générale, un rôle dans le maintien de la solubilité et de la conformation des enzymes.

#### 2.2- Influence des glycannes sur les activités de signalisation des glycoprotéines

Bon nombre d'exemples font état de l'influence de la glycosylation dans les interactions ligand/récepteur de diverses glycoprotéines de signalisation. Ainsi, les N-glycannes présents sur les immunoglobulines (Ig) G jouent un rôle de premier plan dans la liaison avec les récepteurs au fragment clivable des IgG (Fc-R), présents au niveau de la membrane des cellules phagocytaires (Monteiro et al., 1990). C'est également le cas de l'activateur du plasminogène urinaire, pour lequel on a montré que la O-fucosylation de ses domaines EGF est indispensable à l'activation de son récepteur (Rabbani et al., 1992; Dear & Medcalf, 1998). A l'inverse, il a été montré que la présence de glycannes sialylés ou non sur certaines glycohormones, telles que l'EPO (Darling et al., 2002), la FSH (Zambrano et al., 1999) et la « luteinizing hormone » (LH) (Liu et al., 1984), influait très négativement sur sa liaison avec leur récepteur. Dans le cas de l'EPO, on a pu montrer que les charges négatives des acides sialiques mettent en jeu des interactions électrostatiques qui nuisent gravement à l'interaction de l'EPO avec son récepteur EPO-R. Par ailleurs, il a également été montré que la glycosylation pouvait influencer le type de signalisation transduite par un récepteur, sans pour autant affecter sa liaison avec un ligand. En effet, on a pu montrer que la sialylation des Nglycannes, portés par la «β-human chorionic gonadotrophin » (HCG), est fondamentale à la transduction du signal et non à la liaison à son récepteur (Nemansky et al., 1995) et que les Oglycannes (type mucine) sont indispensables à son activité tyrotrophique (Yoshimura & Hershman, 1995). Les activités de signalisation peuvent également être modulées au niveau des récepteurs membranaires, eux-mêmes. La plupart des récepteurs membranaires renferment des N-glycannes, mais leur rôle semble être exclusivement limité à l'aide au repliement protéique, au niveau du RE. Cependant, bon nombre de récepteurs, incluant les récepteurs Notch et ceux des protéines de la famille des « transforming growth factors β » (TGF-β), voient leurs activités de transduction du signal modulées par O-fucosylation (Haltiwanger, 2002).

#### 2.3- Influence des glycannes sur les propriétés immunologiques des glycoprotéines

Les glycannes peuvent moduler les propriétés immunologiques d'une glycoprotéine, en agissant comme masques cryptiques de sites protéiques antigéniques. C'est le cas des mucines, dont la région protéique poly-O-glycosylée renferme un certain nombre de motifs antigéniques masqués par les O-glycannes. Les glycannes, eux-mêmes, constituent des antigènes pouvant déclencher une réponse immunitaire. C'est le cas de l'antigène de Galili

Gal( $\alpha$ 1-3)Gal-R qui, au cours d'expériences de xénogreffes, est à l'origine des phénomènes de rejets, chez l'homme. C'est également le cas d'un certain nombre de ligands microbiens reconnus par un groupe de récepteurs lectiniques, les « Toll-like receptors » (TLR), présents au niveau de la membrane des macrophages et des cellules dendritiques, et qui jouent un rôle de premier plan dans le déclenchement de la réponse immunitaire innée (Barton & Medzhitov, 2003).

#### 2.4- Influence des glycannes sur la clairance des glycoprotéines circulantes

Les glycannes jouent également un rôle important dans la clairance in vivo des glycoprotéines plasmatiques. Leur élimination de la circulation est essentiellement réalisée au niveau du foie par des récepteurs lectiniques aux asialoglycoprotéines, également connus sous le nom de «récepteurs d'Ashwell » (Ashwell & Harford, 1982 ; Weiss & Ashwell, 1989). En effet, ces récepteurs lectiniques reconnaissent des glycoprotéines portant des N- et O-glycannes terminés par des résidus de Gal ou de GalNAc « nus », bien qu'une récente étude révèle que ces récepteurs sont capables de reconnaître des structures sialylées (Park et al., 2005). Ainsi, la forme désialylée de l'EPO, bien que potentiellement très active, a une demi-vie dans la circulation sanguine considérablement réduite, comparée aux glycoformes sialylées (Delorme et al., 1992). De plus, il existe un certain nombre d'autres récepteurs lectiniques aux asialoglycoprotéines, présents au niveau des cellules endothéliales, des cellules dendritiques, des macrophages et des cellules de Kupffer, dont la fonction n'est pas clairement déterminée. Au niveau des cellules impliquées dans la réponse immunitaire innée, ces récepteurs participeraient à la reconnaissance et à la phagocytose de certains agents microbiens pathogènes. Par ailleurs, il existe un autre type de récepteur lectinique impliqué dans la clairance des glycoprotéines circulantes, il s'agit du récepteur à «Man/GalNAc-4-sulfate», également exprimé au niveau des cellules dendritiques et endothéliales (Stahl & Ezekowitz, 1998). Ce récepteur est particulièrement impliqué dans la clairance des glycohormones, qui portent bien souvent des N-glycannes à antennes LacdiNAc sulfatées en position 4 des résidus de GalNAc distaux, et participerait à la modulation de la fécondité (ovulation, implantation embryonnaire), notamment en agissant sur leur taux plasmatique (Mi et al., 2002). Ainsi, la β-HCG et la LH ont une demi-vie dans la circulation bien plus prolongée que leur forme déglycosylée, qui, de plus, ne présentent aucune activité biologique in vivo (Smith & Baenziger, 1992).

## 3- Modulation des processus biologiques par les glycannes des glycoprotéines

Les glycannes, présents à la surface cellulaire, sont responsables de la plupart des interactions que la cellule peut contracter avec son environnement, à savoir une cellule, la matrice extracellulaire, des anticorps, des virus, des bactéries ou encore des hormones peptidiques et des toxines (Varki, 1993 ; Dwek, 1996) (Fig. 6). En effet, comme nous l'avions mentionné en introduction, ces glycannes, de part leur complexité structurale et, donc, leur potentiel à coder multiples informations biologiques, constituent des signaux moléculaires de de reconnaissance spécifiques par des lectines (Sharon & Lis, 2004). Hormis les lectines intracellulaires (Yamashita et al., 1999), qui, comme nous le verrons, sont sollicitées au cours du contrôle-qualité et du trafic intracellulaire des glycoprotéines, il existe d'autres familles de lectines spécialisées, incluant les sélectines, les «sialic acid-binding IgG-like lectins» (SIGLECs) et les galectines, qui, quant à elles, sont sollicitées au cours de multiples processus biologiques, tels que l'adhésion cellulaire, la croissance et la différenciation cellulaires, l'apoptose, l'inflammation, l'immunomodulation, la reproduction et l'embryogénèse. Les galectines sont, de loin, les plus largement distribuées.



**Figure 6 : Schéma illustrant l'implication des glycannes dans la modulation des interactions moléculaires contractées par une cellule avec son environnement** [D'après Saxon & Bertozzi, 2001].

Les sélectines constituent un groupe de lectines spécifiques de l'acide sialique, impliquées dans de nombreuses interactions cellule-cellule, notamment au cours de l'immunité et de l'inflammation. On distingue les sélectines L, exprimées au niveau des leucocytes, les sélectines E, exprimées au niveau des cellules endothéliales activées à la suite d'une stimulation cytokinique proinflammatoire, et les sélectines P, exprimées et stockées au niveau des granules a des plaquettes et des granules de Weibel-Palade des cellules endothéliales. Toutes trois reconnaissent des structures sialylées et substituées en positions 3/4 d'un résidu de GlcNAc par un résidu de Fuc (sialyl-Le X, par exemple). Ce sont par les sélectines E et P des cellules endothéliales activées que les leucocytes, exhibant des déterminants de type sialyl-Le X notamment, sont recrutées au niveau du site inflammatoire et peuvent adhérer au niveau de la paroi endothéliale, avant de pouvoir la traverser et atteindre les tissus inflammés sous-jacents. Les sélectines L, d'expression constitutive, sont impliquées dans la domiciliation des lymphocytes circulants, non encore activés, vers les ganglions lymphatiques, ces derniers quittant la circulation au niveau de capillaires sanguins spécialisés, appelés « high endothelial veinules » (HEV), dont les cellules endothéliales expriment à leur surface les déterminants de type sialyl-Le X.

Les SIGLECs, comprenant une quinzaine de membres, sont également des lectines qui reconnaissent spécifiquement l'acide sialique et sont essentiellement exprimées au niveau des cellules hématopoïétiques (Angata & Brinkman-van der Linden, 2002 ; Varki & Angata, 2006). Elles jouent un rôle de premier plan dans la modulation de la réponse immunitaire. Par exemple, CD22 ou SIGLEC-2, exprimée au niveau des lymphocytes B, module négativement l'activation du récepteur B (BCR) et donc la réponse immunitaire humorale (Doddy *et al.*, 1995). Les SIGLECs 8 et 9 peuvent également moduler la réponse immunitaire innée, en initiant l'apoptose des granulocytes, lorsqu'ils sont exposés à un environnement proinflammatoire trop important (von Gunten & Simon, 2006).

Les galectines, comprenant une quinzaine de membres, sont des lectines reconnaissant spécifiquement les  $\beta$ -galactosides et sont exprimées au niveau d'un très grand nombre de cellules (Rabinovich *et al.*, 1999). Elles sont impliquées dans un grand nombre de processus cellulaires, tels que l'adhésion cellulaire, la croissance cellulaire, l'apoptose, l'activation cellulaire, la mitose, l'immunomodulation, l'inflammation et la reproduction. Elles reconnaissent un très grand nombre de ligands extracellulaires, tels que les protéines de la matrice extracellulaire (laminine, fibronectine), membranaires, tels que les protéines CD43,

CD45 et l'intégrine  $\alpha_7\beta_1$ , et intracellulaires, tels que les protéines associées à la membrane lysosomale (LAMPs), les protéines du cytosquelette (cytokératines), les protéines impliquées dans diverses cascades de signalisation (prolifération / apoptose) et les composants nucléaires de l'épissage des pré-ARNs messagers.

### F- Métabolisme des glycoprotéines

### 1- Biosynthèse des glycoprotéines

## 1.1- Généralités sur la biosynthèse des glycoprotéines

Les processus de biosynthèse des principales classes de glycannes sont localisés au niveau du RE et de l'appareil de Golgi, qui jouent un rôle déterminant dans le trafic intracellulaire, la maturation et la sécrétion des glycoprotéines (Kornfeld & Kornfeld, 1985; Warren & Malhotra, 1998). A ce jour, la seule exception est la O-glycosylation de type O-GlcNAc, qui a lieu dans le cytosol et le noyau (Hart *et al.*, 2007). Au cours de leur cheminement dans la voie de sécrétion, les protéines nouvellement synthétisées sont co- et/ou post-traductionnellement glycosylées, puis, hormis les glycoprotéines résidentes du RE et de l'appareil de Golgi, sont adressées soit au lysosome (hydrolases acides), soit à la membrane plasmique (glycoprotéines membranaires), soit au niveau du milieu extracellulaire (glycoprotéines secrétées), grâce à divers récepteurs lectiniques intracellulaires (Yamashita *et al.*, 1999).

La N-glycosylation débute, au niveau du RE, par l'assemblage d'un précurseur tétradécasaccharidique lié à un lipide polyisoprénique chargé, le pyrophosphodolichol (Dol-P-P), suivi par le transfert cotraductionnel et « en bloc » de ce dernier directement sur la chaîne protéique naissante, au niveau d'un de ses sites consensus « Asn-Xxx-Ser/Thr ». La maturation du tétradécasaccharide N-lié sur les protéines consiste en l'élagage d'un certain nombre de résidus monosaccharidiques par les glycosidases réticulaires et golgiennes, suivi de l'addition de nouveaux résidus monosaccharidiques, par les glycosyltransférases golgiennes. La O-glycosylation est, par ailleurs, réalisée, au niveau de l'appareil de Golgi, exceptions faites des types O-Man et O-Fuc, initiés au niveau du RE, et du type O-GlcNAc, quant à lui, réalisé au niveau du cytoplasme. Elle débute par l'addition d'un monosaccharide directement au niveau des résidus d'acides aminés hydroxylés (Ser, Thr et hLys). L'addition séquentielle d'unités saccharidiques sur les accepteurs (protéines, Dol-P-P ou chaînes glycanniques en élongation), par les glycosyltransférases requiert la présence de donneurs

monosaccharidiques activés (nucléotide-sucres/phosphodolichol-sucres). Les glycosyltransférases, enzymes membranaires de type II, possèdent une spécificité très étroite pour le donneur de sucre activé, l'accepteur et le type de liaison glycosidique, et dont l'activité catalytique peut être fortement influencée par la structure de la chaîne peptidique portant le site de glycosylation. L'activité des glycosyltransférases, de même que celle des glycosidases, requière, pour certaines d'entre elles, la présence d'ions métalliques divalents et de modifications post-traductionnelles, telles que la N-glycosylation, qui, d'une manière générale, modulerait leur activité catalytique, et la phosphorylation de leur domaine cytoplasmique, qui modulerait leur trafic intracellulaire golgien. Leur trafic intracellulaire golgien est également dépendant d'un autre groupe de protéines spécialisées, organisées en un complexe, le complexe « conserved oligomeric Golgi complex » (COG) (Ungar et al., 2002 ; Oka et al., 2004). Ce complexe jouerait un rôle important dans le maintien de la morphologie de l'appareil de Golgi et dans le transport antérograde de certaines protéines résidantes golgiennes vers le compartiment approprié.

De fait, la glycosylation des glycoprotéines dépend de plusieurs facteurs : (1) les mécanismes de régulation de l'expression des gênes codant pour les principaux acteurs des processus de la glycosylation (glycosyltransférases, glycosidases de maturation, transporteurs et enzymes de synthèse de donneurs monosaccharidiques activés ...), qui dépendent de la nature de l'organisme vivant, du stade de développement, du type cellulaire et de son statut fonctionnel (activation et différenciation cellulaires), qu'il soit normal ou pathologique; (2) la disponibilité en substrats des réactions de glycosylation (donneurs de sucres activés et accepteurs), qui est également fonction du taux d'expression des transporteurs de nucléotidesucres et des enzymes ayant en charge leur synthèse ; (3) la compartimentation cellulaire (ou distribution des glycosyltransférases et des glycosidases au sein des compartiments cis-, médian et trans-golgiens); (4) la compétition des glycosyltransférases pour l'accepteur durant l'élongation de la chaîne glycannique; (5) le microenvironnement de chaîne oligosaccharidique en élongation (Schachter, 1986; Hirschberg, 1997; Martin et al., 1998; Varki et al., 1999). De plus, la structure de la chaîne peptidique portant le site de glycosylation peut également affecter l'activité catalytique des glycosyltransférases et être responsable des différences en terme d'hétérogénéité glycannique entre les glycoprotéines, produites par le même type cellulaire, et entre les sites de glycosylation d'une même glycoprotéine (Sheares & Robbins, 1986; Rademacher et al., 1988; Rudd & Dwek, 1997; Jones et al., 2005).

#### 1.2- Métabolisme des nucléotide-sucres

Au cours des processus d'assemblage des chaînes glycanniques des glycoprotéines, chaque monosaccharide est utilisé sous forme d'un intermédiaire activé, lié à un nucléotide par leur fonction réductrice : le nucléotide-sucre (Tableau 2). L'intérêt d'activer ces monosaccharides sous forme de nucléoside-sucres mono- ou diphosphates est d'une part de fixer l'anomérie du sucre donneur, et, d'autre part, de fournir l'énergie nécessaire à la formation des liaisons glycosidiques par rupture des liaisons phosphodiester riches en énergie.

Monosaccharide	Anomérie	Nucléotide
Glc	α	UDP
Man	α	GDP
Fuc	α	GDP
Gal	β	UDP
Xyl	β	UDP
GlcNAc	β	UDP
GalNAc	β	UDP
GlcUA	β	UDP
NeuAc	α	CMP

Tableau 2 : Les principaux nucléotide-sucres utilisés pour la synthèse des glycoprotéines

La figure 7 montre les différentes possibilités pour une cellule de mammifère de disposer de nucléotide-sucres. Tout d'abord, rappelons que les monosaccharides exogènes majeurs, résultant notamment de la digestion des di-, oligo- et polysaccharides alimentaires, sont le Gal, le fructose (Fru) et le Glc. Ces sucres simples sont ensuite absorbés au niveau des bordures en brosse des entérocytes, soit par voie intercellulaire (diffusion passive selon un gradient de concentration au travers des jonctions serrées), soit par voie transcellulaire, au moyen de cotransporteurs membranaires actifs de la famille des « sodium/glucose transporters » (SGLTs). Les monosaccharides quittent ensuite les entérocytes par diffusion facilitée grâce aux transporteurs de la famille « glucose transporters » (GLUTs). C'est d'ailleurs par ce type de transporteurs que ces monosaccharides donneurs pénètrent dans les cellules sécrétrices de glycoprotéines. Cependant, une seconde possibilité de disposer de monosaccharides donneurs est de les biosynthétiser. C'est ainsi que certaines osamines (ManNAc, GlcNAc) et le NeuAc, endogènes, peuvent être synthétisées à partir des trois monosaccharides précurseurs (Gal, Fru et Glc) et/ou d'autres métabolites précurseurs, formés notamment au cours de la glycolyse et de la néoglucogénèse, par des réactions

d'épimérisations et d'interconversions. Enfin, la troisième source possible de monosaccharides donneurs est la «récupération » des produits saccharidiques issus du catabolisme lysosomal des glycoprotéines, que nous détaillerons plus loin.



Figure 7 : Schéma simplifié des voies d'activation et d'interconversion des monosaccharides. Les monosaccharides, symbolisé par , ont une origine exogène (extracellulaire). 1 : Galactokinase, 2 : Hexokinase, 3 : Hexokinase/Mannokinase (bactéries), 4 : Fucokinase, 5 : GalNAc kinase, 6 : GlcNAc kinase, 7 : UDP-Gal pyrophosphorylase (PPase), 8: GDP-Man PPase, 9: GDP-Fuc PPase, 10 : UDP-GalNAc PPase, 11 : UDP-GlcNAc PPase, 12 : UDP-Glc PPase, 13 : Dol-P-Man synthase, 14 : Dol-P-Glc synthase, 15 : UDP-Gal 4-épimérase, 16 : UDP-Glc 6-oxydase, 17 : UDP-GlcUA décarboxylase, 18 : GDP-Man 4,6 déshydratase, 19 : TSTA3, 20 : Phosphoglucomutase 1, 21 : Glc-1-P isomérase, 22 : Man-6-P isomérase, 23 : Phosphomannomutase 1, 24 : Phosphoglucomutase 3, 25 : GlcNH<sub>2</sub>-6-P N-acétyl T, 26 : Glutamine : Fru-6-P transaminase, 27 : UDP-GlcNAc 2-épimérase/ManNAc-6-kinase (GNE/MNK), 28 : NeuAc-9-P synthase, 29 : NeuAc-9-P phosphatase et 30 : CMP-NeuAc synthase.

Une fois disponibles, les monosaccharides sont directement convertis en oses-1-P et oses-6-P, grâce à l'activité de kinases spécifiques (ex : mannokinase, glucokinase, galactokinase ...) ou non spécifiques (hexokinase), cette dernière, ubiquitaire, est capable de phosphoryler en position 6 un grand nombre d'hexoses (Man, Gal, Glc, Fru) (réactions 1 à 6) (Fig. 7). Puis, l'activation des monosaccharides par nucléotidylation (GDP, UDP ou CMP) peut s'opérer, si le donneur est sous forme d'ose-1-P, auquel cas des réactions d'isomérisation seront réalisées (par ex : réactions 20, 24). Par ailleurs, les nucléotide-sucres peuvent être générés soit par réaction d'un nucléoside triphosphates avec le monosaccharide-1-P correspondant (réactions 7

à 12), à l'exception du CMP-NeuAc (réaction 30), soit par des réactions d'isomérisation et d'interconversion à partir d'un nucléotide-sucre déjà formé (réactions 15 à 19). Bien que la plupart des réactions de glycosylation aient lieu dans la lumière du RE et de l'appareil de Golgi, la biosynthèse de la majorité des nucléotide-sucres, quant à elle, est opérée dans le cytoplasme, à l'exception du CMP-NeuAc, synthétisé dans le noyau.

#### 1.3- Biosynthèse des N-glycannes

#### 1.3.1- Initiation de la N-glycosylation au niveau du RE

#### 1.3.1.1- Assemblage du précurseur tétradécasaccharidique

Comme nous l'avions évoqué, la N-glycosylation des protéines débute par l'assemblage d'un précurseur tétradécasaccharidique (Glc<sub>3</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>) lié à un lipide chargé, le pyrophosphodolichol (Dol-P-P), au niveau de la membrane du RE (Fig. 8). Les dolichols, formés à partir du farnésyl-pyrophosphate, un intermédiaire de biosynthèse du cholestérol, sont des lipides polyisopréniques insaturés, comprenant de seize à vingt unités isoprènes, et constituent les plus longues chaînes aliphatiques synthétisées par les cellules de mammifères (Rip et al., 1985). Ce précurseur tétradécasaccharidique résulte de l'action d'une série de glycosyltransférases membranaires (ALG), au cours d'un processus extrêmement conservé au sein des eucaryotes, appelé cycle des dolichols (Burda & Aebi, 1999). La synthèse s'effectue, dans un premier temps, au niveau de la face cytoplasmique, et débute par l'activation du dolichol par addition d'un résidu de phosphate, au niveau de sa fonction hydroxyle, par la dolichol kinase, suivie de l'addition d'un résidu de GlcNAc-1-P, par la Dol-P : UDP-GlcNAc GlcNAc-1-phosphotransférase (GlcNAc-1-P T), à partir d'un donneur de nucléotide-sucre, l'UDP-GlcNAc. La formation du GlcNAc-P-P-Dol est suivie de l'addition séquentielle d'un résidu de GlcNAc et de cinq résidus de Man, respectivement à partir d'UDP-GlcNAc et de GDP-Man, de telle sorte à former le Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-P-P-Dol. Cet intermédiaire de synthèse poursuit son élongation au niveau de la face luminale du RE, après sa translocation par une flipase (RFT 1) (Helenius & Aebi, 2002 ; Helenius et al., 2002). Une fois dans la lumière du RE, la partie glycannique de l'intermédiaire Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-P-P-Dol est allongée de quatre résidus de Man et de trois résidus de Glc, à partir de donneurs lipidiques de sucre activé, le Dol-P-Man et le Dol-P-Glc, respectivement, pour former le précurseur tétradécasaccharidique complet Glc<sub>3</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-P-P-Dol (Burda & Aebi, 1999).

#### 1.3.1.2- Transfert du précurseur tétradécasaccharidique

L'étape suivante de la N-glycosylation des protéines est le transfert cotraductionnel et « en bloc » de l'intermédiaire tétradécasaccharidique sur l'un des sites consensus « Asn-Xxx-Ser/Thr » de la chaîne protéique naissante par un complexe membranaire multiprotéique, l'oligosaccharyltransférase (OST) (Yan & Lennarz, 1999). A l'heure actuelle, l'organisation structurale et la nature des sous-unités constituant l'OST chez les mammifères ne sont pas clairement connues. Cependant, la plupart des travaux consacrés à l'étude biochimique de ce complexe ont été réalisés sur le modèle de levure *Saccharomyces cerevisiae* et ont contribué à une meilleure compréhension concernant la nature et l'organisation structurale des sous-unités du complexe ainsi que leur rôle au sein de ce complexe (Silberstein & Gilmore, 1996 ; Kelleher & Gilmore, 2005). Ainsi, chez la levure, le complexe serait constitué d'au moins neuf sous-unités, organisées en trois sous-domaines : Ost-1p/Ost-5p, Ost-2p/Swp-1p/Wbp-1p et Stt-3p/Ost-4p/Ost-3p/Ost-6p. Par ailleurs, le précurseur oligosaccharidique doit être sous forme triglucosylée afin d'être transféré par l'OST avec un maximum d'efficacité, comme en témoignent les résultats d'expériences réalisées sur des cellules mutantes produisant et transférant des précurseurs oligosaccharidiques tronqués de type Gle<sub>3</sub>Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>.

La reconnaissance du résidu de Glc distal est fondamentale puisqu'elle induirait un changement conformationnel au niveau du site actif de l'OST, et influencerait, de fait, son association avec ses substrats protéiniques (Helenius & Aebi, 2004).

Comme nous le mentionnions plus haut, 2/3 des sites consensus de N-glycosylation sont occupés par des glycannes (Apweiler *et al.*, 1999). La variation dans le taux d'occupation des sites de N-glycosylation dépend fortement des flux métaboliques associés au cycle des dolichols, d'une part, et, d'autre part, de l'efficacité de transfert du précurseur oligosaccharidique sur la chaîne protéique naissante, par l'OST. En effet, l'efficacité de glycosylation par l'OST, différente d'un site à un autre, peut être affecter par un certain nombre de facteurs liés à la configuration structurale du site de N-glycosylation, comme la nature de l'acide aminé hydroxylé (Ser ou Thr), la nature de l'acide aminé Xxx, la nature des acides aminés encadrant le tripeptide « Asn-Xxx-Ser/Thr », la localisation du site par rapport à la séquence protéique et la conformation de la région peptidique portant le site de glycosylation (Jones *et al.*, 2005).

#### 1.3.1.3- Contrôle-qualité des N-glycosylprotéines néosynthétisées

Le transfert cotraductionnel de l'oligosaccharide triglucosylé (Glc<sub>3</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>) a pour conséquence d'augmenter la solubilité des chaînes protéiques naissantes non encore structurées d'une part, et, d'autre part, de faciliter leur mise en conformation en favorisant leur recrutement par des lectines chaperonnes : la calréticuline et la calnexine. (Hebert et al., 2005). Une fois l'oligosaccharide triglucosylé transféré sur la chaîne protéique naissante par l'OST, les deux résidus de Glc distaux sont ensuite séquentiellement éliminés par les  $\alpha$ glucosidases réticulaires I et II, pour permettre aux lectines chaperonnes de lier l'intermédiaire monoglucosylé (Glc1Man9GlcNAc2). L'interaction lectine chaperonne/substrat monoglucosylé peut également être réalisée de manière cotraductionnelle, dès lors que la chaîne glycannique soit positionnée au niveau des 50 premiers résidus N-terminaux de la chaîne protéique naissante (Molinari & Helenius, 2000). De plus, les domaines hydrophobes exposés à la surface des chaînes glycoprotéiniques néosynthétisées non encore repliées sont également reconnus par une autre protéine chaperonne, la protéine Bip, également connue sous le nom de « glucose-regulated protein 78 kDa » (GRP78), dont le rôle est de prévenir d'éventuelles interactions entre les domaines hydrophobes qui engendreraient leur aggrégation au niveau du RE.

Au cours du processus de mise en conformation assistée, les lectines chaperonnes se chargent d'exposer les chaînes peptidiques à une thiol-disulfure oxydoréductase, la protéine « endoplasmic reticulum protein 57 kDa » (ERp57), avec laquelle elles interagissent, et qui catalyse la formation et l'isomérisation des ponts disulfures (Ellgaard & Helenius, 2003 ; Trombetta & Parodi, 2003 ; Helenius & Aebi, 2004). Les glycoprotéines néosynthétisées sont ensuite libérées de la calnexine et de la calréticuline, puis déglucosylées après action de l' $\alpha$ glucosidase réticulaire II, empêchant ainsi leur réassociation avec les lectines chaperonnes. A ce stade, les glycoprotéines mal repliées, qui présentent donc des domaines hydrophobes à leur surface, sont reconnus par une UDP-Glc : glycoprotéine glucosyltransférase (UGT), catalysant la reglucosylation de leur chaîne glycannique, en utilisant comme donneurs de nucléotide-sucre l'UDP-Glc, contrairement aux  $\alpha$ -glucosyltransférases réticulaires I et II. La reglucosylation des glycoprotéines mal repliées a pour effet leur rétention réticulaire pour la reconduite de cycles supplémentaires de mises en conformation assistées de la calréticuline et calnexine, de la protéine chaperonne Bip et de la thiol-disulfure oxydoréductase ERp57. Ainsi, les glycoprotéines néosynthétisées subissent des cycles « gluco/dégluco » tant qu'elles n'auront pas acquis leur conformation correcte.



**Figure 8 :** Schéma de la biosynthèse du précurseur Dol-P-P-OS et de son transfert cotraductionnel sur la chaîne protéique naissante. La synthèse du Dol-P-P-OS débute par la formation d'un premier dérivé heptasaccharidique (Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-P-P-Dol) au niveau de la face cytoplasmique du RE, par les glycosyltransférases ALG 1, ALG 2, ALG 7, ALG 11 et d'autres glycosyltransférases non encore identifiées, et requiert des monosaccharides donneurs sous forme de nucléotide-sucres (UDP-GlcNAc et GDP-Man). Après orientation de ce dérivé vers la face luminale du RE par la flipase RFT 1, la synthèse de la forme mature du précurseur Glc<sub>3</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-P-P-Dol) est achevée, par les glycosyltransférases ALG 3, ALG 6, ALG 8, ALG 9, ALG 10 et ALG 12, et requiert, cette fois, des monosaccharides donneurs sous forme de Dol-P-sucres (Dol-P-Man et Dol-P-Glc). Enfin, l'oligosaccharide est cotraductionnellement transféré sur la chaîne protéique naissante par l'OST. Symboles :  $\bigcirc$ , Glc ;  $\bigcirc$ , Man ;  $\square$ , GlcNAc ;  $\longrightarrow$ , Dol-P.

Le cas échéant, les glycoprotéines qui n'auraient pas acquises leur conformation correcte sont alors éliminées du RE au cours d'un processus appelé «ER-associated degradation» (ERAD), comme nous le verrons dans la partie dédiée au catabolisme cytosolique des glycoprotéines mal conformées. Les glycoprotéines correctement repliées subissent l'action de l'a-mannosidase réticulaire I, responsable de la formation de l'isomère oligomannosidique B (Man<sub>8</sub>GlcNAc<sub>2</sub>), puis poursuivent leur transit vers l'appareil de Golgi, après avoir été reconnues par un groupe de lectines membranaires reconnaissant les N-glycannes de type oligomannosidique, comme les protéines « endoplasmic reticulum-golgi intermediate compartment » (ERGIC)-53 et « vesicle integral protein » (VIP)-36 (Yamashita *et al.*, 1999). Il est à noter que les glycoprotéines quittant le RE peuvent être exportées sous la forme (Man<sub>6-8</sub>GlcNAc<sub>2</sub>), à la suite de l'action des  $\alpha$ -mannosidases réticulaires I et II. Ces enzymes exercent leur activité sur les glycoprotéines résidentes du RE ou sur celles qui auraient séjournées trop longtemps dans le RE.

#### 1.3.2- Maturation des N-glycannes au niveau de l'appareil de Golgi

Bien que les réactions de maturation aient débuté au niveau du RE, elles se poursuivent au niveau de l'appareil de Golgi, aussi bien par des réactions d'élagage que des réactions d'élongation. C'est notamment au niveau de ce compartiment subcellulaire que sont formés les deux autres types de N-glycannes, le type complexe et le type hybride, et le signal d'adressage des hydrolases acides vers le lysosome (Fig. 10 & 11). Par ailleurs, les N-glycannes de type oligomannosidique présents au niveau de certains sites de glycosylation peuvent demeurer tels quels sur les N-glycosylprotéines secrétée.

#### 1.3.2.1- Formation du signal d'adressage des enzymes lysosomaux

La plupart des hydrolases destinées au lysosome y sont adressées par le biais d'un marqueur glycannique spécifique, le Man-6-P, au niveau des compartiments cis/médian golgiens (Fig. 9). Ce marqueur est le résultat de l'action de deux enzymes : l'UDP-GlcNAc glycoprotéines GlcNAc-1-phosphotransférase (GlcNAc-1-P T) et une GlcNAc-1-phosphodiestérase (GlcNAc PDE) (Fig. 11). La GlcNAc-1-P T est un enzyme qui catalyse le transfert d'un résidu de GlcNAc-1-P en position 6 d'un des résidus de Man des N-glycannes de type oligomannosidique et de type hybride des hydrolases. Cet enzyme reconnaît les glycoprotéines lysosomales au niveau de sites peptidiques riches en résidus de Lys (Metcalf & Fusek, 1993 ; Cuozzo *et al.*, 1998). Ensuite, l'action de la GlcNAc PDE a pour effet la

formation de mannosylphosphomonoester (Man-6-P) sur les N-glycannes des hydrolases lysosomales. Au cours du transit dans chacun des trois compartiments golgiens, la maturation des N-glycannes de type oligomannosidique peut se poursuivre et conduire aux deux autres classes de N-glycannes, mais seules les classes de type oligomannosidique et de type hybride présentent ce marquage.

Les hydrolases porteuses du signal Man-6-P sont adressées au lysosome par le biais d'un transport vésiculaire dirigé par deux récepteurs lectiniques spécifiques, appelés « Man-6-P receptors » (MPR) : le récepteur dépendant de cations (CD-MPR) et le récepteur cation-indépendant (CI-MPR) ou « insulin growth factor » (IGF)-II/MPR (Kornfeld & Mellman, 1989 ; Dahms & Hancock, 2002; Ghosh *et al.*, 2003). Ces récepteurs sont présents sur la membrane des compartiments trans-golgiens, des endosomes, des lysosomes et de la membrane plasmique. Les vésicules de transport, qui transmettent les hydrolases néosynthétisées aux endosomes puis au lysosome, bourgeonnent à partir du compartiment trans-golgien (Fig. 11) (Kornfeld, 1987). Au niveau des endosomes, où règne un bas pH, les hydrolases se dissocient des MPR, puis sont délivrées au lysosome, alors que les MPR sont recyclés et redirigés vers le compartiment trans-golgien. Par ailleurs, c'est par le biais des CI-MPR que les cellules sont capables de recapturer, à partir du milieu extracellulaire, les quelques 10% d'hydrolases secrétées qui échappent au mécanisme d'adressage du compartiment trans-golgien au lysosome.



Figure 9 : Trafic intracellulaire des enzymes lysosomaux

# 1.3.2.2- Biosynthèse des N-glycannes de type complexe et de type hybride

Comme le montre la figure 11, la formation des N-glycannes de type complexe et de type hybride débute par un premier élagage des résidus de Man catalysé par une ( $\alpha$ 1-2)-mannosidase golgienne I, au niveau du compartiment cis-golgien. Une fois entré dans le compartiment médian golgien, l'intermédiaire de synthèse Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub> subit l'action de la GlcNAc T I, un enzyme clé de la synthèse des N-glycannes de type complexe et de type hybride, qui catalyse l'ajout d'un résidu de GlcNAc sur la branche ( $\alpha$ 1-3)-mannosidique du noyau (Schachter, 1995, 2000). L'addition de cette antenne ( $\beta$ 1-2)-N-acétylglucosaminyl constitue un signal GO pour l'action de l' $\alpha$ -mannosidase golgienne II, qui catalyse l'élimination des deux résidus de Man liés sur la branche ( $\alpha$ 1-6)-mannosidique, de la fucosyltransférase (FUT) VIII, qui catalyse l'addition d'un résidu de Fuc en ( $\alpha$ 1-6) sur le résidu de GlcNAc proximal, et des autres GlcNAc T (II, IV et V), qui catalyse l'addition d'antennes sur les branches ( $\alpha$ 1-3)- et ( $\alpha$ 1-6)-mannosidiques du noyau pentasaccharidique, formant ainsi les N-glycannes de type complexe multiantennés (Fig. 10).

Sur les N-glycannes de type complexe, la GlcNAc T V n'est active que si la GlcNAc T II ait greffé un résidu de GlcNAc en ( $\beta$ 1-2) sur la branche ( $\alpha$ 1-6)-mannosidique. La GlcNAc T IV est également active sur le dérivé GlcNAc( $\beta$ 1-2)Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub> pour former un N-glycanne de type hybride biantenné. De plus, dans certains cas, les structures peuvent être substituées par une GlcNAc intercalaire, via l'action de la GlcNAc T III. La présence de résidus de GlcNAc T II, IV et V, de l' $\alpha$ -mannosidase golgienne II et de la FUT VIII. Ainsi, l'action de la GlcNAc T III sur l'intermédiaire glycannique GlcNAc( $\beta$ 1-2)Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub> a pour effet de promouvoir la maturation des N-glycannes de type hybride substitués par un résidu de GlcNAc intercalaire.



Figure 10 : Spécificité des GlcNAc-T I-V, à l'origine de la synthèse des antennes des Nglycannes de type complexe et de type hybride.

Les antennes N-acétyl- $\beta$ -glucosaminyl, des N-glycannes de type complexe et de type hybride, sont enfin allongées au niveau du compartiment trans-golgien. L'antenne NeuAc( $\alpha$ 2-6)Gal( $\beta$ 1-4)GlcNAc-R est la plus communément retrouvée chez les N-glycosylprotéines secrétées et est formée par l'action séquentielle de deux groupes de glycosyltransférases : les UDP-Gal : GlcNAc-R ( $\beta$ 1-4)-Gal Ts, ubiquitaires, et les ST6 Gal I & II. Comme nous l'avions mentionné, au début de cet exposé, la présence d'antenne de type 1, sur les Nglycannes, est restreinte à certains tissus et certaines espèces et dépend de l'activité de UDP-Gal : GlcNAc-R ( $\beta$ 1-3)-Gal Ts.

Cependant, aucune des ST6 Gal n'est capable de sialyler efficement les résidus de Gal d'antenne de type I. Il est néanmoins possible de sialyler en ( $\alpha$ 2-3) les antennes LacNAc grâce à l'action d'une des nombreuses CMP-NeuAc : Gal( $\beta$ 1-3/4)GlcNAc-R ( $\alpha$ 2-3)-Sia Ts (ST3 Gal). Chez certaines espèces, hormis l'homme et certains primates, l'acide sialique peut être remplacé par des résidus de Gal liés en ( $\alpha$ 1-3) sur les antennes de type 2, grâce à l'activité d'une UDP-Gal : Gal(β1-4)GlcNAc-R (α1-3)-Gal T, responsable du phénotype Galili (Galili, 1989). Par ailleurs, l'antenne Gal( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-6)-R, dont la synthèse est initiée par la GlcNAc T V, est la cible préférentielle de la  $(\beta 1-3)$ -GlcNAc T(i), enzyme initiant la synthèse des chaînes polyLacNAc ou antigène i. La synthèse de l'antigène I, quant à lui, est initiée par la substitution du produit de réaction de la GlcNAc T(i) par la GlcNAc T(I), pour former l'intermédiaire GlcNAc(\beta1-6)[GlcNAc(\beta1-3)]Gal-R, qui est allongé par l'UDP-Gal : GlcNAc-R (\beta1-4)-Gal T. Les antennes Gal(\beta1-3/4)GlcNAc-R, GalNAc(\beta1-4)GlcNAc-R, de même que les séquences polyLacNAc linéaires (i) ou branchées (I), peuvent également être terminées par des résidus de Fuc, liés en (α1-2) sur des résidus de Gal distaux, par les FUT I et II, et/ou en ( $\alpha$ 1-3/4) sur des résidus de GlcNAc internes ou subterminaux, par les FUT III-VII et IX, pour former les déterminants antigéniques à activités de groupe sanguin Le et ABH. Comme pour l'addition des résidus de GlcNAc, par les GlcNAc T, il existe des signaux STOP et GO pour l'ajout des résidus de Fuc sur les résidus de Gal et de GlcNAc antennaires. Ainsi, la fucosylation en  $(\alpha 1-3/4)$  des résidus de GlcNAc internes et subterminaux, sur les antennes LacNAc de type 1 et de type 2, constitue un signal STOP pour la fucosylation en ( $\alpha$ 1-2) et la sialylation en ( $\alpha$ 2-3/6) des résidus de Gal distaux. La fucosylation en ( $\alpha$ 1-2) des résidus de Gal distaux, sur les antennes LacNAc de type 1 et de type 2, constitue un signal GO pour la fucosylation en ( $\alpha$ 1-3/4) des résidus de GlcNAc subterminaux et, surtout, pour l'addition de résidus de GalNAc et de Gal en ( $\alpha$ 1-3) sur ces mêmes résidus de Gal, pour former les groupes sanguins A et B, respectivement.



**Figure 11 : Schéma de la biosynthèse golgienne d'un N-glycanne de type complexe biantenné et du signal Man-6-P.** Les N-glycosylprotéines destinées à être adressées aux lysosomes subissent l'action de la GlcNAc-1-phosphotransférase (GlcNAc-1-P T) suivie de celle de la GlcNAc-1-phosphodiestérase (GlcNAc PDE) pour la formation du signal Man-6-P, au niveau du compartiment cis-golgien. Les N-glycosylprotéines destinées à être secrétées subissent un premier élagage de trois résidus ( $\alpha$ 1-2)-mannosidiques par l' $\alpha$ -mannosidase golgienne II (Golgi- $\alpha$ -Man I), dans le compartiment cis-golgien, puis l'addition d'un résidu de GlcNAc en ( $\beta$ 1-2) sur la branche ( $\alpha$ 1-3)-mannosidique, par la GlcNAc T I, qui est un signal GO pour l'élagage des deux résidus ( $\alpha$ 1-3/6)-mannosidiques par la Golgi- $\alpha$ -Man II, la formation de la seconde antenne par la GlcNAc T II et la fucosylation en ( $\alpha$ 1-6) du résidu de GlcNAc proximal, par la fucosyltransférase (FUT) VIII, dans le compartiment médian golgien. Enfin, les deux antennes sont allongées en ( $\beta$ 1-4) par des résidus de Gal, par une ( $\beta$ 1-4)-galactosyltransférase (Gal T), eux-mêmes terminés par des résidus de NeuAc en ( $\alpha$ 2-3/6), par une ( $\alpha$ 2-3/6)-sialyltransférase (Sia T), dans le compartiment trans-golgien. Symboles :  $\bullet$ , Man ;  $\blacksquare$ , GlcNAc ;  $\bullet$ , Gal ;  $\blacklozenge$ , NeuAc ;  $\bigstar$ , Fuc.

Les antennes des N-glycannes peuvent également être substituées par des résidus de nature non glucidique, au cours des modifications post-synthétiques comme la sulfatation, la phosphorylation, la méthylation et l'acétylation (Yu & Chen, 2007). En effet, les antennes peuvent également être sulfatées sur les positions 3/6 des résidus de GlcNAc et de Gal, au niveau d'antennes LacNAc, et sur la position 4 de résidus de GalNAc, au niveau d'antennes LacdiNAc, par des sulfotransférases spécifiques qui, comme les glycosyltransférases, utilisent un nucléotide-sulfate, le 3'-phosphoadénosine-5'-phosphosulfate (PAPS), comme donneur de sulfate activé. Enfin, les acides sialiques peuvent être O-acétylés, O-méthylés et Ophosphorylés par des O-acétyltransférases, des O-méthyltransférases et des kinases, qui utilisent, comme donneur, l'acétyl-CoA, le S-adénosylméthionine (SAM) et l'adénosine triphosphate (ATP), respectivement.

#### 1.3.3- Biosynthèse des O-glycannes

A la différence de la N-glycosylation qui implique le transfert cotraductionnel et « en bloc » d'un précurseur oligosaccharidique préassemblé sur les résidus d'Asn, la O-glycosylation des résidus de Ser/Thr fait intervenir l'action séquentielle de plusieurs glycosyltransférases, au niveau de l'appareil de Golgi. Ainsi, l'élaboration d'une chaîne O-glycannique est définie par la compétition de plusieurs glycosyltransférases pour un site protéique accepteur commun, au cours de son transit dans la voie de sécrétion. L'initiation de la O-glycosylation de type mucine, qui est, de loin, le type de O-glycosylation le plus représenté chez les mammifères, est assuré par l'addition d'un résidu d'α-GalNAc, directement sur un résidu de Ser/Thr, pour former une structure appelée antigène Tn (GalNAcα-Ser/Thr). Cette réaction est catalysée par une famille de transférases, les UDP-GalNAc : protéine α-GalNAc Ts ou pp-GalNAc Ts, dont l'expression est tissu/cellule-spécifique (Ten Hagen et al., 2003). L'antigène Tn est ensuite allongé par des résidus de Gal, de GlcNAc et de GalNAc, pour la formation de chacun des noyaux, au niveau des compartiments médian et trans-golgiens. Bien que les réactions de substitutions de l'antigène Tn, pour la formation des noyaux, ressemblent à celles dédiées à la formation et l'élongation des antennes, elles n'impliquent, en revanche, pas les mêmes glycosyltransférases (Fig. 12). De plus, la représentation des noyaux dans les différents types cellulaires et tissulaires n'est pas égale, en raison de l'expression restreinte de certaines glycosyltransférases. Les noyaux 1 et 3 sont respectivement formés par addition d'un résidu de Gal et de GlcNAc, liés en (β1-3) sur l'antigène Tn, grâce à l'action des enzymes : noyau 1 (β1-3)-Gal T et noyau 3 (β1-3)-GlcNAc T. La noyau 1 (β1-3)-Gal T requiert une chaperonne moléculaire spécifique, la protéine « core 1 ( $\beta$ 1-3)-Gal T-specific molecular chaperone » (cosmc), pour qu'elle soit fonctionnelle (Ju & Cummings, 2002). Cette molécule chaperonne est une protéine de la membrane réticulaire impliquée dans le repliement de la noyau 1 ( $\beta$ 1-3)-Gal T. Les noyaux 2 et 4 dérivent respectivement des noyaux 1 et 3 par l'action de deux enzymes : noyau 2 ( $\beta$ 1-6)-GlcNAc T et noyau 4 ( $\beta$ 1-6)-GlcNAc T. Les noyaux 5-8, les moins courants, sont respectivement issus de la substitution de l'antigène Tn par des résidus d' $\alpha$ -GalNAc, de  $\beta$ -GlcNAc, d' $\alpha$ -GalNAc et d'  $\alpha$ -Gal, grâce à l'action de transférases spécifiques.

Il existe de multiples possibilités d'élongation des noyaux O-glycanniques pour la formation des antennes, et, donc, des motifs antigéniques terminaux (Le, ABH, Sda/Cad) (Brockhausen, 1995; van den Steen et al., 1998). La sialylation et la sulfatation des noyaux sont possibles mais empêchent leur élongation, ce qui se traduit par la formation de chaînes O-glycanniques acides courtes. En effet, l'antigène Tn peut également être sialylé en ( $\alpha$ 2-6), grâce à l'action d'une CMP-NeuAc : +/ Gal( $\beta$ 1-3) GalNAc( $\alpha$ 1-O)Ser/Thr ( $\alpha$ 2-6)-sialyl T (ST6 GalNAc), pour former l'antigène sialyl-Tn, qui constitue également un signal STOP pour la formation des noyaux. De plus, la sialylation en ( $\alpha$ 2-3) du résidu de Gal du noyau 1, par la CMP-NeuAc : Oglycannes ( $\alpha$ 2-3) sialyl T (ST3 Gal), est un signal GO pour la sialylation en ( $\alpha$ 2-6) du résidu de GalNAc, par l'une des ST6 GalNAc, mais constitue un signal STOP pour la formation du noyau 2. Comme chez les N-glycannes, les résidus de  $\beta$ -GlcNAc libres, comme c'est le cas pour les noyaux 2 et 4, peuvent être allongés par une UDP-Gal : GlcNAc-R (β1-4)-Gal T, pour former une antenne de type 2. De plus, tout comme chez les N-glycannes, les antennes Gal( $\beta$ 1-4)GlcNAc branchées en ( $\beta$ 1-6) sont les cibles préférentielles de la ( $\beta$ 1-3)-GlcNAc T(i), enzyme initiant la synthèse des chaînes polyLacNAc ou antigène i. Les antennes de type 1 peuvent également prendre naissance des noyaux 2 et 4, grâce à l'activité d'une UDP-Gal : GlcNAc-R (\beta1-3)-Gal T. La synthèse des déterminants à activités de groupe sanguin de type i/I, ABH, Sda/Cad, Le et Galili est aussi effective sur les O-glycannes de type mucine que sur les N-glycannes de type complexe et de type hybride, et implique les mêmes glycosyltransférases du compartiment trans-golgien.



**Figure 12 : Schéma illustrant la biosynthèse des O-glycannes de type mucine.** Symboles :□, GalNAc ; ■, GlcNAc ; ●, Gal ; ◆, NeuAc ; △, Fuc.

#### 2- Catabolisme des glycoprotéines

D'une manière générale, le catabolisme des glycoprotéines intracellulaires à demi-vie longue, résidentes des principaux organites cellulaires, des glycoprotéines exogènes (circulantes) et de la membrane plasmique est réalisé au niveau des lysosomes (Winchester, 2005), tandis que les glycoprotéines intracellulaires à demi-vie courte, comme les glycoprotéines mal conformées provenant du RE, sont prises en charge par un complexe protéolytique multienzymatique cytoplasmique, le protéasome (Wolf & Hilt, 2004). De plus, la part des glycoprotéines dégradées, au niveau du cytoplasme, est faible, comparée à celle des glycoprotéines sécrétées dégradées au niveau du lysosome. Ainsi, le catabolisme lysosomal des glycoprotéines constitue une part importante de l'homéostasie des processus de glycosylation des protéines, comme en témoignent les taux de morbidité et de mortalité importants, observées chez les sujets souffrant de déficits génétiques du catabolisme des glycoprotéines : les glycoprotéinoses.

#### 2.1- Catabolisme cytoplasmique des glycoprotéines

Comme nous l'avons mentionné, le système de dégradation cytoplasmique protéasomale est dédié à la dégradation des protéines cytosoliques à demi-vie courte (facteurs de signalisation cellulaire et de régulation de l'expression génique...), mais également des glycoprotéines ayant échouées dans les processus de mise en conformation assistée par les lectines chaperonnes, au cours de leur contrôle-qualité au niveau du RE (Helenius & Aebi, 2004 ; Hebert & Molinary, 2007). En effet, afin d'éviter leur aggrégation dans le RE, les glycoprotéines mal conformées subissent un premier élagage de leurs chaînes N-glycanniques, pour mettre un terme aux tentatives inutiles de mises en conformation, suivi de leur rétrotranslocation vers le cytoplasme afin d'être pris en charge par le protéasome, dans le cadre de l'ERAD (Ahner & Brodsky, 2004).

Pour ce faire, la première étape consiste en l'élimination du résidu de Glc distal, par l'  $\alpha$ glucosidase réticulaire II, suivie de l'élimination d'un résidu de Man, par l' $\alpha$ -mannosidase réticulaire I, pour former l'isomère B (Man<sub>8</sub>GlcNAc<sub>2</sub>), qui constitue un mauvais substrat pour la reglucosylation par l'UGT et, de fait, met fin aux cycles de mise en conformation assistée par les lectines chaperonnes (Molinari *et al.*, 2003). Les glycoprotéines mal repliées portant ce motif sont ensuite reconnues par un groupe de lectines, les « ER degradation-enhancing  $\alpha$ mannosidase-like » (EDEMs), protéines membranaires du RE appartenant au groupe des ( $\alpha$ 12)-mannosidases de la famille des « glycoside hydrolases » n° 47 (GH 47) (Hosokawa *et al.*, 2001). L'association des protéines EDEMs aux glycoprotéines à éliminer a pour conséquence des réactions de démannosylation, conduisant à la formation des structures Man<sub>5-6</sub>GlcNAc<sub>2</sub>, indispensables à l'ERAD des glycoprotéines mal conformées (Spiro, 2004 ; Hirao *et al.*, 2006). C'est donc liées à une structure penta- ou hexamannosidique que les glycoprotéines sont rétrotransloquées vers le cytoplasme par le biais d'un complexe multiprotéique membranaire, le rétrotranslocon (Plemper & Wolf 1999 ; Tsai *et al.*, 2002).

Durant leur rétrotranslocation, les glycoprotéines sont ubiquitinylées par l'ubiquitine ligase au niveau de leur extrémité N-terminale, puis N-déglycosylées par une peptidyl-N-glycosidase (PNGase) cytosolique afin de faciliter leur protéolyse par le complexe protéasomal (Suzuki *et al.*, 2002 ; Hirsch *et al.*, 2003). Cet enzyme catalyse l'hydrolyse de la liaison N-β-glycosylamine des N-glycosylprotéines pour former des chaînes protéiques dont les résidus d'Asn initialement N-glycosylés sont convertis en résidus d'Asp par déamidation, et des chaînes 1-amino-(N-acétyl-β-glucosaminyl)-oligosaccharidiques libres, qui se désaminent au pH physiologique (Tarentino & Plummer, 1993). Par ailleurs, en dehors des sites peptidiques de reconnaître les N-glycosylprotéines mal conformées présentes dans le cytoplasme (Yoshida *et al.*, 2002). Les protéines ubiquitinylées sont enfin adressées à la sous-unité régulatrice du protéasome, via des protéines de liaison, afin d'y être dégradées par la sous-unité catalytique, qui renferme les multiples activités protéolytiques (Wolf & Hilt, 2004).

Les N-glycannes libérés par la PNGase cytosolique se retrouvent en mélange avec d'autres oligomannosides solubles, libérés des précurseurs Dol-P-P-OS, présents au niveau des faces cytoplasmique (Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-P-P-Dol) et luminale (Glc<sub>3</sub>Man<sub>8-9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-P-P-Dol) du RE (Moore, 1999 ; Suzuki & Funakoshi, 2006). Ces deux événements cataboliques relèvent vraisemblablement de mécanismes de régulation, qui préviendraient les phénomènes de production excessive en précurseurs Dol-P-P-OS. Tandis que les oligomannosides acides (Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-1-P) sont libérés des précurseurs présents sur la face cytoplasmique sous l'action d'une phosphodiestérase, les oligomannosides neutres (Man<sub>8-9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>) sont libérés des précurseurs présents du RE par l'OST. Après leur libération par l'OST, les oligomannosides neutres sont d'abord déglucosylés, par les  $\alpha$ -glucosidases réticulaires, puis rétrotransloqués dans le cytoplasme via un complexe

membranaire, fonctionnant en présence d'ATP et de calcium (Moore *et al.*, 1995). Le catabolisme des oligomannosides libérés dans la lumière du RE (Dol-P-P-OS/glycoprotéines mal conformées) débute par l'action d'une chitobiase cytosolique pour former des structures ne possédant qu'un seul résidu de GlcNAc en position terminale réductrice (Cacan *et al.*, 1996). Puis, ces structures sont digérées par l'α-mannosidase cytosolique pour former des oligosaccharides à cinq résidus de Man. Enfin, le catabolisme final de ces structures s'achève au niveau du lysosome, après leur translocation via un transporteur ATP-dépendant. Quant aux oligomannosides acides (OS-1-P), libérés des Dol-P-P-OS de la face cytoplasmique du RE, ils doivent au préalable subir l'action d'une phosphatase cytosolique suivie de celle d'une chitobiase cytosolique avant d'être transloqués vers le lysosome.

#### 2.2- Catabolisme lysosomal des glycoprotéines

#### 2.2.1- Généralités sur le catabolisme lysosomal des glycoprotéines

Les lysosomes sont des organites hétérogènes du système endomembranaire, qui renferment toute une batterie d'enzymes hydrolytiques impliqués dans la dégradation des biomolécules complexes. Retrouvés dans la plupart des cellules de mammifères, hormis les hématies, ils sont caractérisés par un pH acide (5,2 à 5,5) entretenu par une pompe membranaire à protons ATP-dépendante de type vacuolaire (type V) (Forgac, 1989). Le catabolisme protéique lysosomal constitue une part importante de l'homéostasie cellulaire. La localisation d'une glycoprotéine va déterminer la façon avec laquelle elle va être dégradée, et fait intervenir des mécanismes de régulation fins. En effet, les glycoprotéines destinées à être dégradées dans le lysosome ont soit une origine exogène, comme les glycoprotéines circulantes, soit une origine endogène, comme les glycoprotéines de la membrane plasmique, les glycoprotéines des organites à demi-vie longue ou encore les glycoprotéines accumulées dans les vésicules de secrétions, destinées à être secrétées suite à une stimulation hormonale.

Le catabolisme lysosomal des glycoprotéines met en scène un certain nombre d'hydrolases acides (protéases et glycosidases) qui ont en charge de la digestion complète des glycoprotéines en acides aminés (et dipeptides) et en monosaccharides.

#### 2.2.2- Transport des glycoprotéines vers le lysosome

La localisation et la fonction des glycoprotéines déterminent, d'une part leur demi-vie, et, d'autre part, la route qu'elles emprunteront pour être acheminées au lysosome. En effet, il convient de distinguer quatre catégories de glycoprotéines destinées à être catabolisées au niveau du lysosome : (1) les glycoprotéines intracellulaires à demi-vie longue, présentes dans les organites cellulaires ; (2) les glycoprotéines accumulées dans les vésicules de sécrétion ; (3) les glycoprotéines de la membrane plasmique ; et (4) les glycoprotéines exogènes des milieux extracellulaires et des sécrétions exocrines (mucus) et endocrines (plasma sanguin).

La première catégorie de glycoprotéines est acheminée au lysosome par un processus appelé macroautophagie (Dunn, 1994; Cuervo, 2004). D'une manière générale, ce processus cellulaire consiste en la séquestration d'une fraction de cytoplasme, pouvant inclure un organite entier, dans une vacuole, appelées autophagosome, suivie de sa fusion avec le lysosome. Ce mécanisme est particulièrement sollicité : (1) au cours de la vie fœtale des mammifères, lors d'importants remaniements tissulaires ; (2) lors de remaniements dédiés à l'élimination d'organites défectueux ou en fin de vie ; ou (3) lorsque l'apport en nutriments, notamment en acides aminés circulants, est insuffisant.

La seconde catégorie, quant à elle, est acheminée au lysosome par un processus appelé crinophagie, qui consiste en la fusion des vésicules de sécrétion avec le lysosome, plutôt qu'avec la membrane plasmique par exocytose. C'est un processus par lequel la cellule contrôle la quantité de (glyco)protéines destinées à être sécrétées dans la circulation sanguine.

Enfin, les glycoprotéines exogènes et membranaires sont acheminées au lysosome par hétérophagie ou endocytose, qui est la voie la plus connue (Mellman, 1996). Les glycoprotéines exogènes telles que les hormones, les facteurs de croissance ou encore les glycoprotéines du plasma sanguin peuvent être internalisées soit par un processus endocytique spécifique et régulé, faisant donc intervenir des récepteurs membranaires spécifiques avec formation de vésicules recouvertes de chlatrines, soit par un processus endocytique absorptif non spécifique et constitutif (pinocytose). Quel que soit le mécanisme initiateur de l'internalisation, l'endocytose aboutit à la formation d'un endosome précoce, également appelé phagosome, par invagination de la membrane plasmique. Dans certains cas, la digestion peut débuter dans l'endosome, mais la dégradation totale des substrats endocytés requiert la fusion à un lysosome. Les glycoprotéines de la membrane plasmique sont également acheminées au lysosome par ce même mécanisme. La dégradation de certains récepteurs glycoprotéiniques membranaires peut être régulée, puisque, dans certains cas, seul le ligand est dégradé, et le récepteur, quant à lui, pouvant être recyclé et réacheminé au niveau de la membrane plasmique.

42

#### 2.2.3- Catabolisme lysosomal des glycoprotéines

#### 2.2.3.1-Protéolyse

La protéolyse implique une classe de protéases actives en milieu acide, les cathepsines, qui agissent de manière concertée sur les (glyco)protéines pour former un mélange d'acides aminés et de dipeptides (Mason, 1996). Elles sont classées en fonction de la nature de l'acide aminé qui est impliquée dans l'activité catalytique de ces enzymes : les cathepsines à sérine (A et G), les cathepsines à cystéine (B, C, F, H, K, L, O, S et W) et les cathepsines à acide aspartique (cathepsines D et E). Il convient de distinguer les exopeptidases, qui dégradent les protéines soit depuis leur extrémité N-terminale (aminopeptidases), soit depuis leur extrémité C-terminale (carboxypeptidases), et les endopeptidases, qui exercent leur activité à l'intérieur de la chaîne peptidique. Bon nombre d'entre elles sont ubiquitaires, tandis que d'autres ne sont retrouvées que dans certains tissus. L'acidité qui règne dans le lysosome est propice à l'activité catalytique des cathepsines et à la dénaturation de leur substrat qui facilite leur action.

#### 2.2.3.2- Dégradation des N-glycosylprotéines

C'est grâce aux données collectées des nombreuses recherches consacrées à la caractérisation biochimique du matériel glucidique accumulé dans les cellules et les urines de patients souffrant de glycoprotéinoses que la quasi intégralité du catabolisme lysosomal normal des glycoprotéines a pu être élucidée (cf. partie consacrée aux glycoprotéinoses). La dégradation des N-glycosylprotéines est bidirectionnelle et implique la dégradation complète préalable de la chaîne peptidique par les cathepsines, suivie de la dégradation séquentielle des N-glycannes par les exoglycosidases, qui clivent les liaisons glycosidiques en s'attaquant au monosaccharide en position terminale non réductrice. L'activité des cathepsines sur les Nglycosylprotéines ne requiert pas l'élimination préalable du glycanne et aboutit à la formation de glycoasparagines, ou N-glycosylasparagines. Ensuite, le résidu d'asparagine est éliminé par l'action d'une aspartyl-N-β-glucosaminidase, n'exerçant son activité de clivage de la liaison N-glycosidique que si les fonctions amine et carboxylique du résidu d'asparagine sont libres (Aronson, 1999). Cependant, l'activité de l'aspartyl-N-β-glucosaminidase est nulle sur des glycoasparagines dont les N-glycannes renfermeraient des résidus de Fuc liés en  $(\alpha 1-6)$ aux résidus de GlcNAc proximaux. Elle requiert, en effet, l'intervention d'une première exoglycosidase, l'α-fucosidase, qui catalyse l'élimination des résidus de α-Fuc, qu'ils soient liés en ( $\alpha$ 1-2/3/4) aux antennes LacNAc ou en ( $\alpha$ 1-6) au résidu de GlcNAc proximal des Nglycannes de type complexe et de type hybride fucosylés. De plus, l'homme et le rongeur expriment une N,N'-diacétylchitobiase lysosomale qui catalyse l'élimination du résidu de GlcNAc proximal des N-glycannes (Abraham *et al.*, 1983). Enfin, quelle que soit l'espèce considérée, toutes les étapes du catabolisme des N-glycannes, qu'ils possèdent un ou deux résidus de GlcNAc en position terminale réductrice, sont conservées.

La digestion des N-glycannes de type oligomannosidique est la plus simple puisqu'elle n'implique qu'une seule exoglycosidase, la LAMAN (al Daher *et al.*, 1991). La LAMAN est une  $\alpha$ -mannosidase de classe II, de la famille GH 38, capable de cliver toutes les liaisons  $\alpha$ mannosidique connues (Daniel *et al.*, 1994). La LAMAN exerce son activité sur des structures de type Man<sub>5-9</sub>GlcNAc<sub>1-2</sub> pour former la structure Man( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-4)GlcNAc (ou Man( $\beta$ 1-4)GlcNAc, chez l'homme et le rongeur). De plus, la LAMAN a également en charge le catabolisme final des produits du catabolisme cytosolique des oligomannosides libres, orchestré par l' $\alpha$ -mannosidase cytosolique. Par ailleurs, il convient de préciser qu'il existe une ( $\alpha$ 1-6)-mannosidase lysosomale, uniquement chez les espèces exprimant une N,N'diacétylchitobiase lysosomale (l'homme et le rongeur), qui participe à la dégradation des Nglycannes de type oligomannosidique et de type hybride. Cet enzyme n'est actif que sur des structures ne possédant qu'un résidu de GlcNAc, en position terminale réductrice.

Le catabolisme des N-glycannes de type hybride et de type complexe, quant à lui, fait intervenir un plus grand nombre d'exoglycosidases (Fig. 13). Le catabolisme de ces structures débute par l'élimination des modifications post-synthétiques, comme les résidus de sulfate, de phosphate et d'acétyle, par l'action d'une O-sulfatase, d'une O-phosphatase et d'une O-acétylase, respectivement. Les acides sialiques, les résidus de  $\beta$ -Gal et de  $\beta$ -GlcNAc des antennes sont ensuite séquentiellement éliminés par les  $\alpha$ -sialidases, la  $\beta$ -galactosidase et l'une des N-acétyl- $\beta$ -hexosaminidases, respectivement. La  $\beta$ -galactosidase et l'une des  $\alpha$ -sialidases sont liées par une protéine stabilisatrice, la cathepsine A, et forment un complexe multienzymatique ternaire. L'action séquentielle des enzymes présentés ci-dessus conduit à la formation du noyau pentasaccharidique Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub>, hormis chez l'homme et le rongeur (Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>1</sub>), qui expriment une N,N'-diacétylchitobiase. Les produits penta- ou tétrasaccharidiques trimannosylés sont digérés par la LAMAN (et l'( $\alpha$ 1-6)-mannosidase, chez l'homme et le rongeur) pour donner le produit Man( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-4)GlcNAc (ou Man( $\beta$ 1-4)GlcNAc, chez l'homme et le rongeur), commun aux trois classes de N-glycannes. Chez

l'homme et le rongeur, le catabolisme s'achève par l'action d'une  $\beta$ -mannosidase, pour former du Man et de la GlcNAc, tandis que, chez les autres espèces, le produit de la  $\beta$ mannosidase, le N,N'-diacétylchitobiose, est dégradé par l'une des N-acétyl- $\beta$ hexosaminidases A et B.



Figure 13 : Schéma illustrant le catabolisme lysosomal bidirectionnel des Nglycosylprotéines, chez l'homme. Hormis chez l'homme et le rongeur, qui expriment une N,N'diacétylchitobiase lysosomale, l'activité des  $\alpha$ -sialidases, de la  $\beta$ -galactosidase, des N-acétyl- $\beta$ -hexosaminidases, des  $\alpha$ -mannosidases et de la  $\beta$ -mannosidase s'exerce sur des N-glycannes possédant deux résidus de GlcNAc proximaux. De fait, ce sont les N-acétyl- $\beta$ -hexosaminidases qui achèvent le catabolisme des N-glycannes, par le clivage du N,N'-diacétylchitobiose, formé par l'action de la  $\beta$ -mannosidase. Symboles : , Man ; , GlcNAc ; , Gal ; , NeuAc ; , Fuc.

#### 2.2.3.3- Dégradation des O-glycosylprotéines

Contrairement aux N-glycosylprotéines, il existe peu de données concernant le catabolisme des O-glycosylprotéines, en dehors des protéoglycannes. Il semblerait qu'une protéolyse complète préalable ne soit pas nécessaire et qu'une libération des chaînes O-glycanniques des O-glycosylprotéines soit envisagée. En effet, au cours de la dégradation lysosomale des protéoglycannes, la libération des chaînes de GAG est assurée par une endo-β-xylosidase, avant d'être dégradées par des exoglycosidases et sulfatases spécifiques (Takagaki et al., 1988). De plus, la N-acétyl-α-galactosaminidase, exoglycosidase multifonctionnelle capable d'éliminer les résidus d'a-GalNAc au niveau des extrémités terminales non réductrices, peut également cliver la liaison O-α-glycosidique des O-glycosylprotéines de type mucine. Par ailleurs, les N-glycannes et les O-glycannes de type mucine, ayant en commun des séquences LacNAc pouvant être sialylées et/ou fucosylées, pourraient être séquentiellement dégradées par la même série d'exoglycosidases, comme en témoigne la large spécificité d'action des αsialidases, de la β-galactosidase et des N-acétyl-β-hexosaminidases lysosomales sur les Nglycannes, les glycosphingolipides et les chaînes de GAG. Or, l'analyse du matériel glucidique accumulé dans les urines de patients atteints de déficiences en N-acétyl-agalactosaminidase, en une des α-sialidases ou en cathespin A, a révélé la présence de peptides O-glycosylés sialylés. Ces différents résultats tendent à démontrer que la N-acétyl-agalactosaminidase interagirait transitoirement avec le complexe multienzymatique ternaire pour exercer son activité de peptidyl-O-glycosidase, et, à la suite de quoi, les O-glycannes libérés seraient ensuite dégradés par les activités α-sialidasique et β-galactosidasique du complexe transitoire. De plus, cette hypothèse est soutenue par les résultats de travaux montrant que le complexe multienzymatique ternaire forme un complexe transitoire avec la GalNAc-6-O-Sulfatase, un enzyme clé du catabolisme lysosomal des chaînes de GAG (Pshezhetsky & Potier, 1996).

Cependant, aucune donnée sur l'existence d'enzymes capables d'hydrolyser les autres types de liaisons O-glycosidiques n'a encore été collectée.

# CHAPITRE II :

# LES PATHOLOGIES DU

# METABOLISME DES GLYCOPROTEINES

A-Les pathologies de la biosynthèse des glycoprotéines	
1-Les anomalies congénitales de la glycosylation des protéines (CDG)	
1.1-Définition et classification des CDG.	
1.2-Présentations cliniques	
1.3-Bases moléculaires des CDG	
1.3.1-Les anomalies congénitales affectant la N-glycosylation	
1.3.1.1-Les CDG-I	
1.3.1.2-Les CDG-II	
1.3.1.3-Les mucolipidoses II et III	
1.3.1.4-Les autres anomalies congénitales de la N-glycosylation	
a-La galactosémie congénitale	
b-L'intolérance congénitale au fructose	
c-L'anémie dysérythropoïétique congénitale type II	
d-La « N-hyperglycosylation »	
1.3.2-Les anomalies congénitales affectant la O-glycosylation	
1.3.2.1-Les anomalies congénitales de la O-glycosylation de type O-GalNAc	
1.3.2.2-Les anomalies congénitales de la O-glycosylation de type O-Man	
1.3.2.3-Les anomalies congénitales de la O-glycosylation de type O-Xyl	
1.3.2.4-Les anomalies congénitales de la O-glycosylation de type O-Fuc	
1.3.2.5-Les anomalies congénitales de la O-glycosylation de type O-Gal	
1.3.2.6-Les anomalies congénitales de la sialylation des O-glycannes	58
1.4-Dépistage et étiquetage des CDG	58
1.4.1-Dépistage des CDG	58
1.4.2-Stratégies de typage des CDG	61
2-Les anomalies acquises de la glycosylation des protéines	
2.1-Les cancers	
2.2-L'alcoolisme et les pathologies hépatiques chroniques	64
2.3-Les pathologies inflammatoires chroniques	
2.4-La néphropathie à IgA	65
2.5-La mucoviscidose	
B-Les pathologies congénitales du catabolisme des glycoprotéines	
1-Définitions des anomalies du catabolisme lysosomal des glycoprotéines	
2-Présentations cliniques des patients	
3-Bases moléculaires des glycoprotéinoses et des mucopolysaccharidoses	
3.1-Les glycoprotémoses	
3.1.1-La sialidose et la galactosialidose	
3.1.2-La maladie de Morquio type B	
3.1.3-La maladie de Sandhoft	
$3.1.4-L^{-}\alpha$ -mannosidose	
3.1.5-La β-mannosidose	71

71
72
73
73
74
75
75
76
76
77
77

#### A-Les pathologies de la biosynthèse des glycoprotéines

#### 1- Les anomalies congénitales de la glycosylation des protéines (CDG)

#### 1.1- Définition et classification des CDG

Les CDG constituent un groupe grandissant de pathologies multisystémiques rares, généralement à transmission autosomique récessive, affectant la synthèse des glycannes des glycoprotéines, chez plus de six cents patients dans le monde (prévalence moyenne: 1/20000) (Marquardt & Denecke, 2003 ; Wopereis *et al.*, 2006 ; Freeze, 2007 ; Jaeken & Matthijs, 2001, 2007). Les CDG résultent de dysfonctionnements métaboliques affectant tous les effecteurs de la glycosylation des protéines : les transporteurs de nucléotide-sucres, les enzymes de synthèse des donneurs de sucres activés (Dol-P-sucres et nucléotide-sucres), les glycosyltransférases, les glycosidases, et les protéines structurales du complexe COG.

Pendant longtemps, ce groupe de pathologies n'était exclusivement dominé que par des déficits touchant la N-glycosylation. La dernière classification en date ne recense que les déficits touchant la N-glycosylation (Aebi *et al.*, 1999). Ainsi, les CDG sont subdivisés en deux groupes, les CDG-I et II, en fonction de la position de l'étape métabolique bloquante, dans la voie de biosynthèse des N-glycannes. Les CDG-I, les plus fréquentes, sont caractérisées par des déficits enzymatiques au niveau des voies d'assemblage des Dol-P-P-OS, au niveau du RE. Les CDG-II, quant à eux, résultent de défauts des mécanismes de maturation des chaînes glycanniques liées aux protéines, au cours de leur transit au niveau du RE et de l'appareil de Golgi. Cependant, durant ces dernières années le nombre de CDG s'est agrandie d'un certain nombre de déficits génétiques affectant la O-glycosylation des protéines. Sur le plan moléculaire, les CDG conduisent à une diminution des taux d'occupation des sites de N-glycosylation (CDG-I) et/ou à une modification de la structure primaire des chaînes N- et O-glycanniques des glycoprotéines (CDG-II). Les cas de CDG d'étiologie inconnue sont typés CDG-Ix ou CDG-IIx.

#### **1.2- Présentations cliniques**

Les présentations cliniques des patients varient d'un type de CDG à l'autre et peuvent, dans les cas les plus graves, associer des manifestations neurologiques à de sévères atteintes multiviscérales (Jaeken, 2003 ; Jaeken & Matthijs, 2001, 2007).

Pathologie	Protéine déficiente			
Déficits en N-glycosylation				
CDG-Ia	Phosphomannomutase 2			
CDG-Ib	Phosphomannose isomérase			
CDG-Ic	Dol-P-Glc : Man <sub>9</sub> -GlcNAc <sub>2</sub> -P-P-Dol Glc T			
CDG-Id	Dol-P-Man : Man <sub>5</sub> -GlcNAc <sub>2</sub> -P-P-Dol Man T			
CDG-Ie	GDP-Man : Dol-P Man T			
CDG-If	Facteur de disponibilité du Dol-P-Man et Dol-P-Glc			
CDG-Ig	Dol-P-Man: Man <sub>7</sub> -GlcNAc <sub>2</sub> -P-P-Dol Man T			
CDG-Ih	Dol-P-Glc: Glc <sub>1</sub> -Man <sub>9</sub> -GlcNAc <sub>2</sub> -P-P-Dol Glc T			
CDG-Ii	GDP-Man : Man <sub>1</sub> -GlcNAc <sub>2</sub> -P-P-Dol Man T			
CDG-Ij	UDP-GlcNAc : Dol-P GlcNAc-1-P T			
CDG-Ik	GDP-Man : GlcNAc <sub>2</sub> -P-P-Dol Man T			
CDG-II	GDP-Man : Man <sub>6(8)</sub> -GlcNAc <sub>2</sub> -P-P-Dol Man T			
CDG-Im	Dol-P kinase			
CDG-IIa	GlcNAc T II			
CDG-IIb	Glucosidase I			
Mucolipidoses II et III	UDP-GlcNAc : N-glycosylhydrolase GlcNAc-1-P T			
Déficits en O-glycosylation				
Déficits en O-GalNAc				
- Calcinose familiale tumorale	UDP-GalNAc : Protéine GalNAc T III			
- Syndrome de l'antigène Tn	Protéine cosmc			
Déficits en O-Xyl				
- Forme progéroïde du syndrome d'Ehlers-Danlos	(β1-4)-Gal T VII			
- Exostoses multiples héréditaires (HME) type 1	EXT 1			
- HME type 2	EXT 2			
- HME type 3	EXT 3			
- Dystrophie cornéenne maculaire (MCD) type 1&2	PAPS : GlcNAc 6-sulfotransférase (S T)			
- Dysplasie spondylo-épiphysaire type Omani	PAPS : Chondroïtine 6-S T I			
- Dysplasie spondylo-épiphysaire type Pakistanais	PAPS synthase 2			
- Dysplasie diastrophique	Antiport sulfate/chlore			
- Atelostéogénèse type II	Antiport sulfate/chlore			
- Achondrogénèse type Ib	Antiport sulfate/chlore			
- Dysplasie polyépiphysaire type 4	Antiport sulfate/chlore			
Déficits en O-Man				
- Syndrome de Walker-Warburg (WWS)	GDP-Man : Proteine O-Man T (POMT 1/2) et/ou			
	Fukutine et/ou Fukutin-Related Protein (FKRP)			
- Syndrome de Santavuori (MEB)	UDP-GICNAC : Proteine-O-Man (β1-2)-GICNAC T I (POMGT 1) et/ou FKRP			
- CMD des ceintures type 2K (LGMD2K)	POMT 1			
- Dystrophie musculaire de Fukuyama	Fukutine			
- Dystrophie musculaire congénitale (CMD) type 1C	FKRP			
- CMD des ceintures type 2I (LGMS2I)	FKRP			
- CMD type 1D	LARGE (POMGT-like)			

# Tableau 3 : Les anomalies congénitales de glycosylation

Pathologie	Protéine déficiente		
Déficit en O-Fuc			
- Dysostose spondylocostale type 3	UDP-GlcNAc : Protéine-O-Fuc (β1-3)GlcNAc T		
Déficit en O-Gal			
- Syndrome d'Ehlers-Danlos type 4	Lysylhydroxylase 1		
Anomalies de la sialylation des O-glycannes			
- Sialurie type français	GNE		
- Myopathie héréditaire à corps d'inclusion de type 2	GNE		
- Myopathie distale avec vacuoles bordées	GNE		
Déficits combinés en N- et O-glycosylation			
CDG-IIc (LAD II)	Transporteur GDP-Fuc		
CDG-IId	UDP-Gal : GlcNAc-R (β1-4)-Gal T I		
CDG-IIe	COG-7		
CDG-IIf	Transporteur CMP-NeuAc		
CDG-IIg	COG-1		
CDG-IIh	COG-8		

Tableau 3	: Les	anomalies	congénitales	de	glycosylatic	on (suite)
	• = • •				8-,	(34100)

Les principales présentations cliniques des enfants malades sont essentiellement une hypotonie axiale, une hypoplasie cérébelleuse, des retards mentaux et psychomoteurs, des retards développementaux, des hépatopathies, des coagulopathies et une ésotropie. Après l'adolescence, les sujets peuvent présenter des signes cliniques supplémentaires, tels qu'une ataxie, une dysarthrie, une absence de puberté chez les sujets féminins, des anomalies oculaires, une scoliose progressive et des anomalies articulaires. La variabilité des signes cliniques des patients est en grande partie responsable du sous-diagnostic de ces pathologies. La mortalité est d'environ 20%, au cours des cinq premières années de la vie, puis décroit avec l'âge des patients.

# 1.3- Bases moléculaires des CDG

#### 1.3.1- Les anomalies congénitales affectant la N-glycosylation

# 1.3.1.1- Les CDG-I

Comme nous l'avons mentionné, les CDG-I résultent de déficits enzymatiques de la synthèse des précurseurs Dol-P-P-OS au sein du RE. L'analyse fine des différentes mutations à l'origine des CDG-I montre qu'elles sont toutes caractérisées par des activités enzymatiques résiduelles. Une perte totale de l'activité d'un des enzymes impliqués dans l'assemblage des Dol-P-P-OS serait létale (Lowe & Marth, 2003).



Figure 14 : Les déficits génétiques du cycle des dolichols : Les CDG-I. Symboles : •, Glc ;•, Man ; ■, GlcNAc ; —, Dol-P.
A l'heure actuelle, on dénombre treize CDG-I (Ia-m), pouvant affecter : (1) la production et la mobilisation des donneurs monosaccharidiques activés (CDG-Ia, Ib, Ie et If), et ainsi causer une diminution de production en Dol-P-P-OS matures (Glc<sub>3</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-P-P-Dol) ; ou (2) l'assemblage des Dol-P-P-OS, aussi bien au niveau de la face cytoplasmique (CDG-Ii-k,m), qu'au niveau de la face luminale du RE (CDG-Ic, Id, Ig, Ih et Il), et ainsi causer une synthèse anormale en Dol-P-P-OS immatures tronqués (Tableau 3 ; Fig. 14). Le CDG-Ia, résultant d'une déficience en phosphomannomutase (PMM) 2, est, de loin, l'anomalie la plus fréquente. Le CDG-Ib, causé par une déficience en phosphomannose isomérase (PMI), est la seule anomalie traitable par supplémentation orale en Man (de Lonlay et al., 1999). Tous les CDG-I conduisent essentiellement à une hypoglycosylation des glycoprotéines, qu'elles soient cellulaires ou secrétées. Cette hypoglycosylation résulte en faite d'une diminution du taux de transfert des précurseurs tétradécasaccharidiques sur les sites de N-glycosylation par l'OST, qui est la conséquence (1) d'une production en quantité insuffisante de précurseurs oligosaccharidiques matures (Glc<sub>3</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-P-P-Dol); et/ou (2) de la synthèse de Dol-P-P-OS immatures tronqués, qui constituent de mauvais substrats pour l'OST. Hormis l'altération de la fonction biologique des glycoprotéines par hypoglycosylation, l'accumulation d'intermédiaires de synthèse ou de Dol-P-P-OS tronqués au niveau du RE participe également à la pathogénèse des CDG-I. De plus, tous les CDG-I connus conduisent à une augmentation de la fucosylation associée à une diminution du nombre d'antennes des N-glycannes des glycoprotéines sériques (Callewaert et al., 2003). Malgré l'ensemble des données disponibles sur les CDG-I, il subsiste néanmoins un certain nombre de patients souffrant de CDG-I d'étiologie inconnue (CDG-Ix).

#### 1.3.1.2- Les CDG-II

Les CDG-II regroupent un certain nombre d'anomalies de la maturation des chaînes glycanniques liées aux glycoprotéines au niveau du RE et de l'appareil de Golgi. Comparés aux CDG-I, les CDG-II semblent avoir une prévalence moins importante et sont beaucoup moins connus. Le CDG-IIb, qui résulte d'une déficience en  $\alpha$ -glucosidase I, est caractérisé par la formation d'un oligosaccharide diagnostique, le tétrasaccharide Glc<sub>3</sub>Man<sub>1</sub>, par une endo- $\alpha$ -mannosidase du compartiment cis-golgien (Völker *et al.*, 2002). Hormis le CDG-IIb, tous les autres CDG-II se traduisent par une altération de la structure primaire des chaînes glycanniques des glycoprotéines, qu'elles soient cellulaires ou secrétées. Le CDG-IIa, résultant d'une déficience en GlcNAc T II, conduit à une synthèse anormale de N-glycannes

tronqués de l'antenne liée en ( $\beta$ 1-2) sur la branche ( $\alpha$ 1-6)-mannosidique du noyau. Compte tenu du fait que la maturation des N-glycannes de type complexe requiert le même équipement enzymatique que certaines formes de O-glycosylation, certains CDG-II se traduisent par un déficit combiné de la N- et O-glycosylation (Tableau 3). Le CDG-IId, causé par une déficience en UDP-Gal: GlcNAc-R (\beta1-4)-Gal T I, conduit à une synthèse incomplète des antennes LacNAc des O-glycannes de type mucine et des N-glycannes de type hybride et de type complexe, réduites à un résidu de GlcNAc. Le CDG-IIc, également connu sous la dénomination « leukocyte adhesion deficiency » (LAD) II, causé par un déficit du transport de GDP-Fuc, est responsable d'une hypofucosylation des N- et des O-glycannes des glycoprotéines et, surtout, d'une disparition des ligands endothéliaux (sialyl-Le X) des sélectines E et P, présents au niveau de la membrane des leucocytes, qui se traduit par une leucocytose périphérique et des infections microbiennes récurrentes (Anderson & Springer, 1987). Le CDG-IIf, causé par un déficit du transport en CMP-NeuAc, est responsable d'une diminution significative de la sialylation des glycoprotéines et des glycolipides de la membrane de la plupart des cellules de l'organisme, et surtout des ligands endothéliaux des sélectines leucocytaires, causant des symptômes voisins de ceux de la LAD-II, bien que la sialylation des glycoprotéines sériques ne soit pas affectée (Martinez et al., 2005). Les CDG-IIe, IIg et IIh, respectivement causés par des déficits en trois des huit sous-unités du complexe structural COG, les protéines COG-7, COG-1 et COG-8, se traduisent par une altération de la compartimentation, du trafic intracellulaire et de l'activité des transporteurs de nucléotidesucres, des glycosyltransférases et des glycosidases golgiennes. Cependant, compte tenu du très grand nombre de gènes codant pour les effecteurs des processus de glycosylation au niveau de l'appareil de Golgi, près de cinq cents, bon nombre de déficits génétiques restent à identifier, et, pour cause, près de 20% des cas mondiaux de CDG sont d'étiologie inconnue (Marquardt & Denecke, 2003 ; Jaeken, 2003).

#### 1.3.1.3- Les mucolipidoses II et III

Les mucolipidoses II (I-Cell disease) et III (pseudo-Hurler polydystrophy) constituent des pathologies génétiques très rares de la biosynthèse des N-glycannes, causées par une déficience en un enzyme, l'UDP-GlcNAc : N-glycosylhydrolase GlcNAc-1-P T, responsable de la formation du signal d'adressage lysosomal au Man-6-P des hydrolases (Tondeur *et al.*, 1971 ; Kumar *et al.*, 2005). Elles se traduisent par une absence de la majorité des hydrolases acides du lysosome, qui se retrouvent alors secrétées dans le milieu extracellulaire.

Cependant, ces pathologies sont également classées dans le groupe des glycoprotéinoses, puisqu'elles s'accompagnent d'une surcharge lysosomale en composés glucidiques partiellement dégradés, qui résultent notamment de l'absence en glycosidases spécialisées dans le catabolisme des glycoprotéines.

## 1.3.1.4- Les autres déficits génétiques de la N-glycosylation

Il existe un certain nombre de pathologies génétiques affectant, de manière directe ou indirecte, la N-glycosylation, et, ce, de manière restreinte à certains types cellulaires. Pour certaines d'entre-elles, l'étiologie génétique reste encore inconnue.

## a- La galactosémie congénitale

La galactosémie congénitale regroupe des déficits génétiques en trois enzymes du métabolisme du galactose : l'UDP-Gal pyrophosphatase (PPase), UDP-Gal 4-épimérase et la galactokinase 1 (Fig. 7) (Stibler *et al.*, 1997 ; Charlwood *et al.*, 1998). Certaines de ces déficiences enzymatiques conduisent à une anomalie secondaire de la N-glycosylation. Une déficience en UDP-Gal PPase conduit, en effet, à une accumulation intracellulaire en Gal-1-P et, donc, affecte la concentration en UDP-Gal, destiné à être utilisé comme donneur au cours des réactions de galactosylation, au niveau de l'appareil de Golgi (Lai *et al.*, 2003). De plus, de récentes études ont montré que, chez des patients atteints de déficiences en UDP-Gal PPase, leur sérotransferrine (STf) est caractérisée par une diminution significative du taux d'occupation des sites de N-glycosylation, d'une part, et par une altération de la structure primaire des chaînes N-glycanniques, d'autre part (Sturiale *et al.*, 2005). Par ailleurs, bien qu'une suppression de Gal de l'alimentation permette d'inverser ces processus, les patients conservent néanmoins des symptômes neurologiques.

## b-L'intolérance congénitale au fructose

L'intolérance congénitale au fructose résulte d'une déficience en aldolase B, qui conduit à une accumulation intracellulaire en fructose au niveau des hépatocytes (Jaeken *et al.*, 1996; Adamowicz & Pronicka, 1996). Comme nous l'avons vu, le fructose est un métabolite clé du métabolisme des nucléotide-sucres, et son accumulation intracellulaire affecte également la concentration en différents nucléotide-sucres (Fig. 7). Cette pathologie conduit, en

conséquence, à une hypoglycosylation de glycoprotéines plasmatiques comme la STf (Adamowicz *et al.*, 2007) et de l' $\alpha_1$ -antitrypsine (Hillebrand *et al.*, 2000).

#### c- L'anémie dysérythropoïétique congénitale type II

L'anémie dysérythropoïétique congénitale (CDA) type 2, également connue sous la dénomination anglosaxonne « hereditary erythroblastic multinuclearity with a positive acidified-serum lysis test » (HEMPAS), est une pathologie congénitale de l'érythropoïèse (Fukuda, 1999). Elle doit sa dénomination au fait qu'un sérum sain renferme des molécules d'IgM capables de se lier aux hématies des patients souffrant de l'HEMPAS et d'induire leur lyse, ce qui a pour conséquence l'acidification du sérum. L'étiologie génétique de cette maladie reste à l'heure actuelle inconnue. Les glycoprotéines circulantes du plasma sanguin, produites en grande partie par le foie, ne semblent pas être affectées, chez les patients. Cette pathologie résulterait d'une collection variable de déficits génétiques touchant les processus de glycosylation. En effet, chez certains patients, on a pu déterminer que le gène codant pour l'α-mannosidase golgienne II est muté, ce qui se traduit par une accumulation de N-glycannes de type hybride sur certaines glycoprotéines de la membrane des hématies (protéines de bande 3 et de bande 4.5) (Iolascon et al., 1997). Chez d'autres patients, une déficience génétique en GlcNAc T II, spécifique des cellules érythroïdes, a été découverte, et conduit à la formation de structures tronquées, similaires à celles constatées au cours d'un CDG-IIa. Il a été proposé que la déficience en GlcNAc T II est à l'origine d'une hypoglycosylation des glycoprotéines membranaires des hématies, à l'origine de leur reconnaissance par les IgM.

#### d- La « N-hyperglycosylation »

Cette dénomination atypique regroupe un certain nombre de pathologies génétiques causées par la création d'un nouveau site de N-glycosylation sur certaines glycoprotéines codées par les gènes portant la mutation. En effet, la présence de sites N-glycosylés supplémentaires, ou « N-hyperglycosylation », peut altérer les propriétés physicochimiques des glycoprotéines, en affectant, par exemple, leur conformation, leur oligomérisation, ou encore leur assemblage au niveau de la membrane plasmique. C'est le cas de la mutation du gène codant pour la fibrilline 1, un composant majeur des microfibrilles extracellulaires de la plupart des tissus conjonctifs, responsable du syndrome de Marfan, qui conduit à la création d'un site de N-glycosylation inapproprié, altérant ainsi son repliement et l'assemblage de ses sous-unités (Raghunath *et al.*, 1995 ; Lonnqvist *et al.*, 1996). Par ailleurs, la « N-hyperglycosylation »

peut également conduire à une diminution significative, voire une perte totale de l'activité biologique des glycoprotéines. C'est le cas chez trois patients, présentant des susceptibilités génétiques aux pathologies mycobactériennes, homozygotes pour une mutation touchant le gène codant pour le récepteur de l'interféron  $\gamma$  (INF  $\gamma$ -R2), créant un nouveau site de N-glycosylation au niveau de son domaine de liaison à son ligand (INF  $\gamma$ ) (Vogt *et al.*, 2005). Cette mutation n'affecte ni sa conformation ni sa localisation membranaire, mais cause une perte totale de la réponse cellulaire à l'INF  $\gamma$ .

## 1.3.2- Les anomalies congénitales affectant la O-glycosylation

## 1.3.2.1- Les anomalies congénitales de la O-glycosylation de type O-GalNAc

Seules deux anomalies congénitales de la O-glycosylation de type mucine sont connues, à ce jour. La calcinose familiale tumorale est causée par un déficit en UDP-GalNAc : polypeptide GalNAc T III, enzyme initiant la synthèse des O-glycannes de type mucine au niveau de l'appareil de Golgi, de la plupart des tissus épithéliaux à secrétions exocrines (Slavin *et al.*, 1993). Elle doit son nom à l'importante phosphatémie et aux dépôts calciques massifs dans les tissus cutanés et sous-cutanés des patients. La seconde anomalie congénitale, récemment caractérisée, est le syndrome de l'antigène Tn, une pathologie autoimmune causée par une des mutations somatiques du gène codant pour la protéine cosmc (Ju & Cummings, 2005). Chez les patients souffrant de cette pathologie, une sous-population de cellules de la lignée hématopoïétique exprime à sa surface des antigènes Tn. L'expression de cet antigène a pour conséquence une réponse autoimmune, orchestrée par les anticorps anti-Tn naturellement présents dans le sérum humain, et évoluant vers une anémie, une thrombocytopénie et une leucopénie.

#### 1.3.2.2- Les anomalies congénitales de la O-glycosylation de type O-Man

La O-mannosylation est essentiellement retrouvée au niveau des glycoprotéines musculaires et cérébrales. Au niveau du tissu musculaire squelettique, les O-glycannes de type O-Man constituent près de 70% de la masse d'une des deux sous-unités du dystroglycanne, l' $\alpha$ -dystroglycanne, composante extracellulaire du complexe multiprotéique membranaire dystrophine-dystroglycannes ( $\alpha/\beta$ ), qui assure la jonction serrée entre les fibres d'actine du cytosquelette et les molécules de laminine 2 de la matrice extracellulaire (Chiba *et al.*, 1997 ; Henry & Campbell, 1999 ; Winder, 2001). Ce complexe est exprimé aussi bien dans les tissus

nerveux que les tissus musculaires lisses. Les déficiences enzymatiques de la biosynthèse des O-mannosylglycannes de l'α-dystroglycanne sont à l'origine de sept dystrophies musculaires congénitales (CMD) (Tableau 3) (Endo & Toda, 2003). Le syndrome de Walker-Warburg constitue la forme la plus sévère des CMD et est causé par une déficience en une des deux GDP-Man : protéine O-Man T (POMT 1 et 2). La coexpression des POMT 1 et 2, au niveau du RE, est nécessaire au transfert d'un résidu de Man sur un résidu de Ser/Thr de l'adystroglycanne. Le déficit génétique en POMT 1 est responsable d'une autre CMD, la CMD des ceintures type 2K (LGMD2K). Le syndrome de Santavuori, également connu sous la dénomination anglo-saxonne de « Muscle-Eye-Brain » (MEB), est causé par une déficience en UDP-GlcNAc : O-mannosylprotéine (β1-2)-GlcNAc T (POMGT 1), enzyme catalysant le transfert d'un résidu de GlcNAc sur le résidu de Man O-lié, pour la formation d'une antenne LacNAc, au niveau de l'appareil de Golgi. Par ailleurs, quatre autres CMD, considérées comme des déficits putatifs de la biosynthèse des O-mannosylglycannes de l'adystroglycanne, ont été décrites : la dystrophie musculaire de Fukuyama, la CMD type 1C, la CMD des ceintures type 2I et la CMD type 1D. La première CMD est causée par une déficience en fukutine, supposée être une glycosyltransférase (Aravind & Koonin, 1999), les deux CMD suivantes, par une déficience en une protéine homologue à la fukutine, la «Fukutin-Related Protein» (FKRP), également supposée être une glycosyltransférase (Brockington et al., 2002), et la dernière CMD, par une déficience en protéine LARGE (POMGT-like) (Brockington et al., 2005) (Tableau 3). Par ailleurs, de nombreuses études ont montré que la mutation des gènes codant pour ces trois effecteurs putatifs de la Omannosylation peut également causer le syndrome de Walker-Warburg, le MEB et la CMD des ceintures type 2K.

## 1.3.2.3- Les anomalies congénitales de la O-glycosylation de type O-Xyl

Les protéoglycannes constituent des composés essentiels des matrices extracellulaires et sont impliquées dans de nombreux processus biologiques, tels que l'adhésion, la différenciation et la croissance cellulaires. Un certain nombre d'anomalies congénitales de la biosynthèse de leurs chaînes de GAG ont été rapportées. Hormis les présentations neurologiques et multisystémiques, ces pathologies se caractérisent, pour la plupart d'entre-elles, par des anomalies du développement du tissu ostéocartilagineux. Ainsi, une déficience en ( $\beta$ 1-4)-Gal T VII, qui catalyse l'élongation du résidu de Xyl par un résidu de Gal, cause la forme progéroïde du syndrome d'Ehlers-Danlos (Tableau 3) (Quentin *et al.*, 1990 ; Gotte & Kresse,

2005). Le syndrome des exostoses multiples héréditaire (HME), quant à lui, constitue le CDG le plus fréquent, avec une transmission autosomale dominante, et résulte de déficiences enzymatiques de la biosynthèse des chaînes d'héparine et d'héparane-sulfates (Zak *et al.*, 2002). Ainsi les HME type 1, type 2 et type 3 résultent respectivement d'un déficit en une des trois exostosines : EXT 1, EXT 2 et EXT 3 (Tableau 3). EXT 1 et EXT 2, deux copolymérases organisées sous la forme d'un complexe au niveau de l'appareil de Golgi, sont, toutes deux, requises pour la synthèse des unités disaccharidiques [GlcUA( $\beta$ 1-4)]<sub>n</sub>, tandis que le rôle de l'EXT 3 n'est pas encore connu. De plus, la plupart des propriétés biologiques des protéoglycannes sont conférées par la sulfatation de leur chaîne de GAG, déficiente au cours de sept chondrodysplasies (Tableau 3), toutes caractérisées par de graves anomalies du développement squelettique, et résultant de mutations au niveau des gènes codant soit pour une sulfotransférase, comme la PAPS : kératane 6-O-sulfotransférase (Akama *et al.*, 2000) ou encore la PAPS : chondroïtine 6-O-sulfotransférase I (Thiele *et al.*, 2004), soit pour l'antiport sulfate/chlore (Dawson & Markovich, 2005), soit pour la PAPS synthase (Venkatachalam, 2003).

#### 1.3.2.4- Les anomalies congénitales de la O-glycosylation de type O-Fuc

Le seul déficit enzymatique de la O-fucosylation, rapporté à ce jour, est celui de l'UDP-GlcNAc : Protéine-O-Fuc ( $\beta$ 1-3)-GlcNAc T, qui catalyse la réaction d'allongement du résidu de Fuc O-lié sur la chaîne protéique par un résidu de GlcNAc. Ce déficit cause la dysostose spondylocostale type 3, caractérisée par une anomalie de la segmentation vertébrale, qui a lieu au cours de l'embryogénèse, due à une anomalie de transduction des signaux prodéveloppementaux orchestrés par les récepteurs de la famille Notch (Rampal *et al.*, 2007 ; Turnpenny *et al.*, 2007).

## 1.3.2.5- Les anomalies congénitales de la O-glycosylation de type O-Gal

Ce type de O-glycosylation est restreint aux molécules de collagènes matricielles de nombreux tissus conjonctifs. La seule anomalie congénitale de ce type de O-glycosylation est le syndrome d'Ehlers-Danlos type 4, causé par un déficit en lysyl oxydase 1, enzyme catalysant la conversion post-traductionnelle de la lysine en hydroxylysine, qui constitue le site de O-Gal de ces molécules (Yeowell & Walker, 2000).

#### 1.3.2.6- Les anomalies congénitales de la sialylation des O-glycannes

A ce jour, trois pathologies congénitales de la biosynthèse du CMP-NeuAc sont connues pour causer des anomalies de la sialylation des O-glycosylprotéines. Il s'agit de la sialurie type français (Montreuil *et al.* 1968 ; Fontaine *et al.* 1968), qui résulte d'un défaut génétique de rétroinhibition de l'UDP-GlcNAc 2-épimérase/ManNAc kinase (GNE/MNK) par le CMP-NeuAc, et de deux myopathies congénitales, la myopathie héréditaire à corps d'inclusion type 2 (Askanas & Engel, 1998) et la myopathie distale avec vacuoles bordées (Ceuterick & Martin, 1996), qui résultent, quant à elles, de déficiences génétiques en GNE. Les patients souffrant de ces pathologies sont essentiellement caractérisés par de sévères atteintes musculaires progressives. La sialurie type français conduit à une augmentation de la concentration intracellulaire en CMP-NeuAc et, de fait, conduit à une hypersialylation des N-glycannes de type mucine à noyau 1, sans pour autant influencer la sialylation des N-glycannes (Wopereis *et al.*, 2006). A l'inverse, les myopathies à corps d'inclusions, caractérisées par une déficience génétique en GNE, conduisent à une diminution significative du taux de CMP-NeuAc intracellulaire et à une importante hyposialylation de l' $\alpha$ -dystroglycanne (Huizing *et al.*, 2004).

#### 1.4- Dépistage et étiquetage des CDG

#### 1.4.1- Dépistage des CDG

Les dysfonctionnements multisystémiques, tels que des syndromes hépatogastroentérologiques (hépatopathies, entéropathies) et hématologiques (coagulopathies, leucocytoses), des pathologies inflammatoires chroniques et des dysmorphies, associés à des syndromes neurologiques (retards mentaux et psychomoteurs, neuropathies périphériques et anomalies cérébelleuses), sont autant d'éléments de suspicion clinique d'un CDG (Jaeken, 2003 ; Marklová & Albahri, 2007).

Cependant, il existe un certain nombre d'anomalies métaboliques congénitales, comme les cytopathies mitochondriales, qui peuvent se traduire par certaines de ces manifestations cliniques, responsables du sous-diagnostic de certains CDG, d'où la nécessité d'une confirmation sur le plan biochimique (Briones *et al.*, 2001). En effet, la détection d'une altération de la glycosylation des protéines, chez des patients atteints de CDG, peut être réalisée par l'analyse biochimique d'un certain nombre de glycoprotéines sériques (Harrison

et al., 1992; Krasnewich & Gahl, 1997), et d'une glycoprotéine du liquide céphalo-rachidien, la «β-trace protein» (Pohl et al., 1997; Grünewald et al., 1999). A l'heure actuelle, les différents tests de dépistage rapide des CDG, réalisés dans les différents laboratoires, sont basés sur la détection des formes hypoglycosylées de deux modèles glycoprotéiniques sériques standards, la sérotransferrine (STf) et l'apolipoprotéine C-III (apo-CIII). Bien que toutes les glycoprotéines sériques semblent être affectées par ces déficits génétiques, la STf constitue le glycobiomarqueur sérique le plus sensible aux modifications de la Nglycosylation, et se caractérise par une glycosylation très simple, à savoir, deux sites de Nglycosylation (Asn<sup>413</sup> et Asn<sup>611</sup>), majoritairement occupés par un N-glycanne biantenné bisialylé (Keir et al., 1999). L'apo-CIII, non N-glycosylée, est une O-glycosylprotéine constituée de trois O-glycannes de type mucine à noyau 1, portée par le résidu de Thr<sup>94</sup> : Gal( $\beta$ 1-3)]GalNAc, NeuAc( $\alpha$ 2-3)Gal( $\beta$ 1-3)GalNAc et NeuAc( $\alpha$ 2-6)[NeuAc( $\alpha$ 2-3)Gal( $\beta$ 1-3)]GalNAc, la forme monosialylée constituant la forme majeure (Vaith et al., 1978). L'analyse des glycoformes de la STf, utilisée comme glycobiomarqueur des anomalies de la N-glycosylation, a été envisagée par de nombreuses approches électrophorétiques, chromatographiques (HPLC) et spectrométriques (MS) (Marklová & Albahri, 2007). Cependant, en routine, le dépistage rapide des CDG est réalisé par isoélectrofocalisation (IEF) de la STf et de l'apo-CIII (Fig. 15) (Yamashita et al., 1993; Wopereis et al., 2003, 2007; Marklová & Albahri, 2007).

Le profil d'IEF de la STf, provenant d'un sérum contrôle, met en évidence une microhétérogénéité glycannique, caractérisée par la présence d'une bande majeure, la tétrasialo-STf (S4), et d'autres bandes mineures, la trisialo- (S3), la pentasialo- (S5) et l'hexasialo-STf (S6), possédant respectivement un et deux N-glycannes triantennés trisialylés (Fig. 15A). D'une manière générale, chez les patients atteints de CDG, les N-glycannes des glycoprotéines peuvent soit être manquants (CDG-I), soit être tronqués (CDG-II), ce qui se traduira, sur un profil d'IEF de la STf, par une diminution, voire une perte de charges négatives, initialement portées par les résidus de NeuAc terminaux (S0-S6). Ainsi, en fonction du type de déficit, il a été défini deux types de profil d'IEF de la STf : le type 1, caractérisé par une diminution de l'intensité des bandes cathodiques S2 et S0, et le type 2, caractérisé par une augmentation des bandes S1 et S3. Le profil de type 1 indique l'absence d'un N-glycanne entier, et, donc, résulte d'un CDG-II. Il en est de même pour l'IEF de l'apo-CIII,

dont le profil normal est caractérisé par la présence de trois bandes S0, S1 et S2, correspondant respectivement aux trois O-glycannes de type mucine à noyau 1 : asialo-, monosialo- et bisialo-apo-CIII (Fig. 15B). Ainsi, une anomalie de synthèse des O-glycannes de mucine à noyau 1 consisterait en une diminution significative de l'intensité des glycoformes sialylées (S1 et S2) associées à une augmentation de l'intensité de la glycoforme asialylée S0.



Figure 15 : Profils d'IEF de la STf (A) et de l'apo-CIII (B) de sérums contrôle C versus patients atteints de CDG-I, II et IIx [D'après Marklová & Albahri, 2007 (A) et Wopereis *et al.*, 2003 (B)].

Cependant, les tests d'IEF de la STf et de l'apo-CIII, seuls, ne permettent pas de mettre en évidence tous les types de CDG. Par exemple, l'IEF de l'apo-CIII ne permet de détecter que les déficits en O-glycosylation de mucine à noyau 1, les CDG-IIc, IIe, IIf, IIg et IIh. L'IEF de la STf, quant à elle, ne permet pas de détecter les CDG-IIb, IIc, IIf et la CDA. De plus, certaines pathologies, telles que l'intolérance congénitale au fructose (Jaeken *et al.*, 1996; Adamowicz & Pronicka, 1996), la galactosémie congénitale (Stibler *et al.*, 1997; Charlwood *et al.*, 1998), l'alcoolisme chronique (Malagolini *et al.*, 1989; Arndt, 2001), la fibrose cystique (Larsson *et al.*, 1998; Rhim *et al.*, 2004), le syndrome urémique hémolytique (de Loos *et al.*, 2002) ou encore certaines pathologies hépatodégénératives (Stibler & Hultcrantz, 1987), conduisent également à une modification des profils d'IEF de la STf et constituent des anomalies secondaires de la glycosylation.

Par ailleurs, la détection des formes hypoglycosylées de la STf, comme d'autres Nglycosylprotéines sériques, telles que l' $\alpha_1$ -antitrypsine, l' $\alpha_1$ -antichymotrypsine ou encore l'haptoglobine, a également été envisagée par d'autres approches analytiques, telles que l'électrophorèse en gel d'acrylamide monodimensionnelle (1D-PAGE) dénaturante (SDS-PAGE) ou bidimensionnelle (2D-PAGE) couplée à une immunorévélation (Séta et al., 1996) ou à une lectinographie (Hansske et al., 2002), l'électrophorèse en gel d'agarose (Keir et al., 1999), l'électrophorèse capillaire (CE) (Tagliaro et al., 1998, 1999; Crivellente et al., 2000; Wuyts et al., 2001; Lanz et al., 2004; Bortolotti et al., 2007), la chromatographie liquide (HPLC) sur colonnes d'échanges d'ions (mono-Q) (Jeppsson et al., 1993 ; Arndt, 2001) et de lectines immobilisées, couplée à une détection en ultra-violet (UV) ou MS (Lacey et al., 2001), ou encore la spectrométrie de masse en mode « electrospray ionisation » (ESI-MS) et en mode « matrix-assisted laser desorption/ionization » (MALDI-MS) (Wada, 2007). Contrairement aux approches séparatives (HPLC, CE, PAGE), utilisant des méthodes de détection spectrophotométrique, qui offrent néanmoins la possibilité de quantifier les glycoformes des glycoprotéines tests, les approches MS sont capables de différencier une altération de la glycosylation par perte d'un glycanne entier (CDG-I) d'une altération de la séquence primaire des glycannes (CDG-II). Cependant, compte tenu de la faible sensibilité, du coût élevé ou de la mise en œuvre complexe de certaines d'entre-elles, ces approches ne peuvent pas être envisagées en routine ou en première intention de diagnostic biochimique des CDG, d'une part, et, d'autre part, ne constituent que des stratégies confirmatives des tests d'IEF de la STf et de l'apo-CIII.

## 1.4.2- Stratégies de typage des CDG

Les profils de glycoformes anormales de la STf, obtenues par les différentes approches analytiques, présentées plus haut, sont généralement révélateurs d'un CDG. Cependant, ce premier dépistage doit être validé par un certain nombre d'approches analytiques complémentaires, comme la détection de glycoformes anormales d'autres modèles glycoprotéiniques sériques, tels que l' $\alpha_1$ -antitrypsine, la « tyroxin-binding protein » (TBP) ou encore l'antithrombine III, par IEF ou SDS-/2D-PAGE. De plus, lorsqu'un CDG-I a été détecté (profil d'IEF de la STf de type 1), des examens biochimiques et cliniques supplémentaires permettront d'exclure l'éventualité d'une anomalie secondaire de la N-glycosylation (alcoolisme chronique ou récent, pathologies inflammatoires chroniques, galactosémie et intolérance au fructose ...). Par ailleurs, lorsque la détection des formes

hypoglycosylées de la STf et/ou d'autres glycoprotéines sériques échoue, et qu'il règne une grande suspicion de CDG, comme c'est notamment le cas des patients souffrant de CDG-IIb, IIc et IIf, il est légitime de poursuivre quelques analyses biochimiques complémentaires. En effet, la détection par chromatographie sur couche mince du tétrasaccharide urinaire Glc<sub>3</sub>Man<sub>1</sub> conduit au dépistage du CDG-IIb (de Praeter *et al.*, 2000). Les CDG-IIc et IIf peuvent être détectés par des expériences de lectinographie de l'antigène sialyl-Le X, réalisées sur des échantillons de membranes leucocytaires (neutrophiles). Enfin, le dépistage de ces CDG doit être confirmé par la recherche de mutations sur les gènes suspectés d'être déficients.

La première phase du typage des CDG-I, révélés par l'IEF de la STf et d'autres glycoprotéines sériques, consiste en la recherche de CDG-Ia, qui constitue, de loin, le CDG le plus fréquent (environ cinq cents patients sur les quelques six cents cas de CDG mondiaux) et de CDG-Ib. En effet, la mesure de l'activité des enzymes PMM et PMI sur des leucocytes ou des fibroblastes peut confirmer ou infirmer les cas de CDG-Ia et Ib, respectivement. Bien que les CDG-I constituent des anomalies congénitales de la N-glycosylation, la possibilité d'une altération de la O-glycosylation ne doit pas être exclue, puisque chez un cas de CDG-Ig, il a été montré que la glycophorine A, une O-glycosylprotéine de type mucine, présentait une anomalie de sa O-glycosylation (Zdebska et al., 2003). Les tests d'activités enzymatiques sont, enfin, confirmés par des analyses mutationnelles des gènes codant pour l'une ou l'autre de ces deux enzymes candidats. Dans certains cas, où la suspicion de CDG-I persiste, une analyse mutationnelle du gène codant pour la glycosyltransférase réticulaire ALG 6, peut orienter le clinicien vers le diagnostic d'un CDG-Ic. Par ailleurs, si toutes ces analyses biochimiques s'avèrent infructueuses, l'extraction des précurseurs Dol-P-P-OS de fibroblastes, préalablement radiomarqués au Man tritié, suivie de la caractérisation structurale de la partie glycannique conduit à l'identification de la voie métabolique bloquante du cycle des dolichols (Powell et al., 1994; Gao, 2005). L'analyse mutationnelle du ou des gènes candidats, proposés à la suite de la caractérisation structurale des Dol-P-P-OS, est importante au typage final du cas de CDG-I.

Le typage des CDG-II, en revanche, est bien plus complexe. Dans certains cas de CDG-II, l'IEF de l'apo-CIII, réalisée en tandem avec celle de la STf, renseigne d'emblée sur des déficits de la N- et de la O-glycosylation. Des expériences de lectinographie de certaines structures glycanniques, portées par des glycoprotéines de la membrane de leucocytes ou de fibroblastes, peuvent aiguiller l'analyste vers certaines déficiences enzymatiques. De plus, des expériences d'immunolocalisation de transporteurs de nucléotide-sucres (Zhao *et al.*, 1999) et des protéines COG (Ungar *et al.*, 2002) peuvent également renseigner sur des anomalies en terme de compartimentation et de trafic intracellulaire. Le dépistage et le typage des CDG-II peuvent surtout être réalisés par la mise en œuvre d'approches de glycomique, appliquées à l'étude de la structure fine des chaînes N- et O-glycanniques des glycoprotéines sériques totales ou particulières (ces approches seront présentées en détail dans le chapitre 3). Les résultats de ces approches conduisent à la proposition d'un certain nombre de gènes candidats (glycosyltransférases, glycosidases, transporteurs, protéines COG ...), qui feront l'objet d'une analyse mutationnelle, pour finaliser le typage du cas de CDG-II.

#### 2- Les anomalies acquises de la glycosylation des protéines

#### 2.1- Les cancers

Tout comme les cellules normales au cours de l'embryogénèse, les cellules cancéreuses subissent des phases d'activation et de croissance cellulaires intenses, adhèrent à d'autres types cellulaires et à d'autres matrices extracellulaires, et envahissent, en conséquence, les tissus. Comme nous l'avions mentionné, la glycosylation peut être modifiée au cours du développement embryonnaire et de l'activation cellulaire, et, de ce fait, au cours des processus de transformation maligne. De plus, ces changements de glycosylation donnent lieu à l'apparition anormale de nouvelles structures glycanniques, regroupées sous le terme d'antigènes glucidiques associés aux tumeurs. Les principales modifications de la glycosylation, généralement observées dans les cancers, sont une augmentation du branchement en ( $\beta$ 1-6) par des résidus de GlcNAc sur la branche ( $\alpha$ 1-6)-mannosidique des Nglycannes (surexpression de la GlcNAc T V), un raccourcissement des O-glycannes de type mucine (T, Tn, sialyl-Tn), des modifications de la sialylation des N- et O-glycannes et de l'acétylation des acides sialiques, la réexpression d'acide N-glycolyl-neuraminique (NeuGc), l'expression d'antigènes à activités de groupe sanguin de type ABH et de type Lewis, l'expression des ligands glucidiques des sélectines, une augmentation de l'expression des galectines et des séquences polylactosaminiques à la surface des cellules, et une modification de la sulfatation des N- et O-glycannes (mucine et GAG). On a pu montrer que certains de ces changements, tels que l'augmentation du taux d'antennarisation en ( $\beta$ 1-6) des N-glycannes et l'expression des ligands glucidiques des sélectines, participent activement à la physiopathologie des cancers, notamment au caractère invasif de certains d'entre-eux qui forment des métastases (Dennis *et al.*, 1999 ; Varki, 1999 ; Hakomori, 2002).

#### 2.2- L'alcoolisme et les pathologies hépatiques chroniques

Les sujets atteints d'alcoolisme chronique sont caractérisés par une altération de la Nglycosylation de leur STf sérique, à savoir une diminution du taux de N-glycosylation et de sialylation (Stibler *et al.*, 1987 ; Malagolini *et al.*, 1989 ; Arndt, 2001). L'intoxication par l'éthanol conduit à une perturbation des processus de glycosylation, comme une diminution jusqu'à 50% des activités des glycosyltransférases, impliquées dans la synthèse des chaînes de type complexe, causée par l'acétaldéhyde, composé formé au cours de la biotransformation hépatique de l'éthanol (Stibler & Borg, 1991 ; Ghosh *et al.*, 1993 ; Xin *et al.*, 1995 ; Cottalasso *et al.*, 1996 ; Lakshman *et al.*, 1999). D'autres pathologies affectant le foie, comme le carcinome hépatocellulaire et la cirrhose hépatique, se caractérisent par des anomalies de glycosylation ressemblant à celles observées chez les patients atteints de CDG-I. Elles comprennent, notamment, une augmentation de la fucosylation en ( $\alpha$ 1-6) des résidus de GlcNAc proximaux et de l'ajout de résidus de GlcNAc intercalaire, associés à une diminution de l'antennarisation, de la sialylation et de la galactosylation des N-glycannes des glycoprotéines sériques (Noda *et al.*, 1998 ; Callewaert *et al.*, 2003 ; Morelle *et al.*, 2006).

## 2.3- Les pathologies inflammatoires chroniques

Certaines pathologies inflammatoires chroniques, affectant les muqueuses des tractus respiratoires et digestifs, notamment, sont connues pour être associées à de profondes modifications de la glycosylation des mucines, rappelant celles observées au cours de certains adénocarcinomes bronchiques et digestifs. C'est le cas, par exemple, de la bronchite chronique, caractérisée par une augmentation de la sialylation et de la sulfatation des mucines bronchiques (Davril *et al.*, 1999). Cependant, la glycosylation de glycoprotéines circulantes, plus particulièrement, les immunoglobulines (IgG, IgA), peut également être profondément modifiée au cours de multiples pathologies inflammatoires chroniques, telles que la polyarthrite rhumatoïde, la maladie de Cröhn, le syndrome de Sjögren, le lupus érythémateux disséminé et toute une variété de maladies autoimmunes (Arnold *et al.*, 2007). Prenons l'exemple du syndrome de Sjögren, une pathologie inflammatoire chronique caractérisée par des taux plasmatiques importants en IgA1 et IgA2, résultant d'une augmentation de la sialylation de leurs glycannes. Les résidus de Gal masqués par les résidus de NeuAc ne

peuvent plus être reconnus et éliminés par les récepteurs lectiniques aux asialoglycoprotéines, au niveau du foie, et s'accumulent dans le plasma sanguin, exacerbant ainsi les processus inflammatoires (Basset et al., 1999; 2000). Par ailleurs, hormis le syndrome de Sjögren et quelques rares exemples, les pathologies inflammatoires chroniques sont caractérisées par des anomalies affectant la glycosylation des IgG; nous prendrons l'exemple de la polyarthrite rhumatoïde, la plus documentée sur ce sujet. C'est une pathologie autoimmune multifactorielle chronique très fréquente, caractérisée par une profonde atteinte inflammatoire du tissu conjonctif ostéocartilagineux périphérique (articulations). L'étiologie de cette maladie reste, à l'heure actuelle, encore inconnue, mais des facteurs hormonaux, génétiques et environnementaux sembleraient être impliqués dans sa pathogenèse. La polyarthrite rhumatoïde est caractérisée par une diminution de la galactosylation (Parekh et al., 1985) associée à une augmentation de l'ajout de résidus de GlcNAc intercalaire et de fucose substituant en (α1-6) les résidus de GlcNAc proximaux (Gornik et al., 1999) des N-glycannes des IgG. Cette maladie est caractérisée par la production d'autoanticorps dirigés contre les fragments Fc et Fab des IgG agalactosylées, appelés facteurs rhumatoïdes (Carson et al., 1987). Des études ont montré que les taux de glycoformes agalactosylées corrèlent avec l'activité et la sévérité de la pathologie, et participent à la pathogénèse (Rook et al., 1991; Rademacher et al., 1994 ; Bond et al., 1996). L'absence des résidus de Gal terminaux a pour effet de découvrir les résidus de Man des glycannes, qui peuvent être reconnus par la « mannose-binding protein » (MBP), une lectine proinflammatoire, impliquée dans l'activation du complément lectine-dépendante, entretenant ainsi les processus inflammatoires (Malhotra et al., 1995).

#### 2.4- La néphropathie à IgA

La néphropathie à IgA constitue un syndrome néphrotique caractérisée par un dépôt, non inflammatoire, d'IgA1 circulant au niveau du mésangium glomérulaire rénal, conduisant ainsi à une insuffisance rénale (Conley *et al.*, 1980). Au cours de cette maladie, les IgA1, se caractérisent par une diminution de la sialylation et de la galactosylation terminale de leurs O-glycannes de type mucine, et ne sont alors plus éliminées par les récepteurs lectiniques aux asialoglycoprotéines, au niveau du foie, causant ainsi leur accumulation dans le plasma sanguin (Allen *et al.*, 2001). L'altération de la O-glycosylation a pour effet de diminuer la stabilité de la structure tridimensionnelle des IgA1, d'une part, et, d'autre part, de stimuler leur autoaggrégation et leur adhésion aux protéines matricielles du mésangium rénal. La

concentration locale en IgA1 polymérique, au niveau du mésangium glomérulaire rénal, a pour effet d'exacerber la réponse inflammatoire. De plus, la présence d'une sous-population de structures N-glycanniques de type Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>, sur les polymères IgA1, accumulés au niveau du mésangium glomérulaire rénal, permet le recrutement de la MBP, déclenchant ainsi l'activation du complément, par la voie lectine-dépendante. L'activation du complément a pour effet d'associer un syndrome inflammatoire à une néphropathie à IgA.

#### 2.5- La mucoviscidose

La mucoviscidose, également appelée fibrose cystique, est une pathologie génétique, à transmission autosomale récessive, des glandes exocrines, causée par diverses mutations du gène codant pour le « cystic fibrosis transmembrane conductance regulator » (CFTR), exprimé au niveau de la langue, du pancréas, du système biliaire, et des voies respiratoires. Ce déficit génétique est responsable d'une déficience dans le transport du chlore au travers de la membrane apicale des cellules épithéliales. Cette pathologie se traduit par une anomalie de la fonction épithéliale associée à une obstruction progressive des conduits muqueux, qui va conduire à une obstruction des voies aériennes, des infections respiratoires chroniques, une insuffisance pancréatique et diverses autres anomalies gastroentérologiques. La fibrose cystique s'accompagne d'une diminution de la sialylation des glycoprotéines secrétées associée à une augmentation de la sufatation et de la fucosylation des mucines. Ces modifications de la glycosylation des protéines s'expliquent par le fait que le déficit en transporteur d'ions chlorure se traduit par une altération du gradient de pH au niveau de l'appareil de Golgi, influençant, de fait, l'activité des glycosyltransférases et des sulfotransférases résidentes (Larsson *et al.*, 1998 ; Rhim *et al.*, 2004 ; Schulz *et al.*, 2007).

#### B-Les pathologies congénitales du catabolisme des glycoprotéines

#### 1- Définitions des anomalies du catabolisme lysosomal des glycoprotéines

Comme pour les CDG, il existe un certain nombre d'anomalies congénitales du catabolisme des glycoprotéines, causées par des déficiences en glycosidases ou en leurs cofacteurs. Ces déficits sont subdivisés en deux groupes : les glycoprotéinoses (Michalski, 1996 ; Michalski & Klein, 1999 ; Thomas, 2001) et les mucopolysaccharidoses (Neufeld & Muenzer, 2001) (Tableau 4). Ces déficits génétiques se transmettent sur le mode autosomal récessif. L'incidence des glycoprotéinoses est comprise entre 1/250000 et 1/1000000, tandis que celle

des mucopolysaccharidoses, plus fréquentes, est de l'ordre de 1/25000 (Reuser et al., 1994). Tandis que les mucopolysaccharidoses, résultent de déficiences enzymatiques du catabolisme lysosomal des protéoglycannes, les glycoprotéinoses, qui nous intéressent tout particulièrement dans ce manuscrit, résultent de défauts enzymatiques du catabolisme lysosomal des glycoprotéines hors protéoglycannes (Fig. 16). Les mucolipidoses de type II et III constituent deux cas particuliers de glycoprotéinoses puisque le déficit génétique réside en l'absence du signal d'adressage des hydrolases (Man-6-P) vers le lysosome. Dans le cas des glycoprotéinoses, la déficience en l'une des glycosidases a pour conséquence le blocage de la voie catabolique complète et donc l'accumulation de glycannes ou de glycopeptides (glycoasparagines, O-glycosylsérines et O-glycosylthréonines de type mucine) partiellement dégradés au sein du lysosome. Compte tenu du fait que le catabolisme des glycoprotéines et des glycolipides puisse impliquer la même série de glycosidases (par exemple,  $\alpha$ -sialidases,  $\beta$ galactosidase et N-acétyl-\beta-hexosaminidases), les glycoprotéinoses peuvent s'accompagner d'une accumulation en glycosphingolipides (gangliosides) et/ou en chaînes de GAG partiellement dégradées. Le matériel glucidique, accumulé dans les lysosomes, se retrouve à terme éliminé par cytolyse dans les compartiments extracellulaires, puis dans les urines et le plasma sanguin des patients. Dans l'urine des patients souffrant de glycoprotéinoses, les structures glucidiques majeures sont généralement des N-glycannes, possédant un ou deux résidus de GlcNAc proximaux, en fonction de l'espèce.

## 2- Présentations cliniques des patients

Les glycoprotéinoses, comme les mucopolysaccharidoses, entrainent une surcharge lysosomale en matériel glucidique partiellement dégradé, conduisant à l'hypertrophie du lysosome, qui écrase les autres organites cellulaires, et, à terme, à une hypertrophie cellulaire. A l'exception du système nerveux et des tissus osseux et cartilagineux, la physiopathologie de ces pathologies est dominée par une organomégalie, concernant essentiellement le foie et la rate. D'une manière générale, l'accumulation de matériel glucidique entraîne un certain nombre de lésions anatomiques, à l'origine des présentations cliniques caractéristiques des patients : des retards mentaux et psychomoteurs, des dysmorphies, une hépato(spléno)mégalie, une opacité cornéenne, une perte d'audition et des dysostoses multiples.

## 3- Bases moléculaires des glycoprotéinoses et des mucopolysaccharidoses

# 3.1- Les glycoprotéinoses

## 3.1.1- La sialidose et la galactosialidose

La sialidose (Durand *et al.*, 1977 ; Strecker & Michalski, 1979), anciennement connue comme la mucolipidose I, est causée par une déficience en  $\alpha$ -sialidase. Cette pathologie est caractérisée par une surcharge lysosomale essentiellement en N- et en O-glycannes sialylés, et en O-glycosylpeptides de type mucine à noyau 1 sialylés : NeuAc( $\alpha$ 2-3)Gal( $\beta$ 1-3)]GalNAc-R et NeuAc( $\alpha$ 2-6)[NeuAc( $\alpha$ 2-3)Gal( $\beta$ 1-3)]GalNAc-R (Strecker *et al.*, 1976, 1977 ; Michalski *et al.*, 1977 ; Dorland *et al.*, 1977 ; van Pelt *et al.*, 1988, 1989).

Pathologie	Protéine déficiente	Matériel accumulé	
Mucopolysaccharidoses (MPS)			
MPS I (Hurler)	α-iduronidase Dermatane/Héparane-sulfates		
MPS II (Hunter)	IdoUA-2-O-sulfatase	Dermatane/Héparane-sulfates	
MPS IIIA (San filippo)	Héparane sulfates N-sulfatase	Héparane-sulfates	
MPS IIIB (San filippo)	N-acétyl-α-glucosaminidase	Héparane-sulfates	
MPS IIIC (San filippo)	Acétyl-Co A α-GlcNAc N-acétyltransférase	Héparane-sulfates	
MPS IIID (San filippo)	GlcNAc-6-O-sulfatase	Héparane-sulfates	
MPS IVA (Morquio)	GalNAc-6-sulfatase	Kératane-sulfates	
MPS IVB (Morquio)	β-Galactosidase	Kératane-sulfates	
MPS VI (Maroteaux-Lamy)	GalNAc-4-O-sulfatase	Dermatane-sulfates	
MPS VII (Sly)	β-Glucuronidase	Dermatane/Héparane-sulfates	
Glycoprotéinoses			
Sialidose	α-sialidase	-sialidase N-/O-glycannes sialylés Peptides-O-GalNAc sialylés	
Galactosialidosis	Cathepsine A	N-/O-glycannes sialylés Peptides-O-GalNAc sialylés	
Maladie de Morquio type B	β-galactosidase	N-/O-glycannes terminés par β- Gal	
Maladie de Sandhoff	N-acétyl-β-glucosaminidase	N-/O-glycannes terminés par β- GlcNAc	
α-Mannosidosis	α-mannosidase	N-glycannes Man <sub>2-9</sub> GlcNAc <sub>1</sub>	
β-Mannosidosis	β-mannosidase	β-Man-β-GlcNAc	
Aspartylglucosaminurie	Aspartyl-N-β-glucosaminidase	β-GlcNAc-Asn et glycoasparagines	
Fucosidose	α-fucosidase	α-Fucosyl-β-GlcNAc-Asn et glycoasparagines fucosylés	
Maladie de Schindler Maladie de Kanzaki	N-acétyl-α-galactosaminidase (α-galactosidase B)	Peptides-O-GalNAc substitués ou non et N-/O-glycannes terminés par α-GalNAc	

## Tableau 4 : Les mucopolysaccharidoses et les glycoprotéinoses

De plus, comme nous l'avons vu, dans la section consacrée au catabolisme lysosomal normal des glycoprotéines, l' $\alpha$ -sialidase exerce son activité au sein d'un complexe enzymatique ternaire, en coopération avec la  $\beta$ -galactosidase et la cathepsine A, cette dernière jouant le rôle de protéine de stabilisation du complexe. Ainsi, la galactosialidose, qui combine une déficience à la fois en  $\alpha$ -sialidase et en  $\beta$ -galactosidase, est causée par la mutation du gène codant pour la cathepsine A, empêchant ainsi les autres protagonistes du complexe enzymatique de fonctionner (d'Azzo, 2001). La galactosialidose conduit à l'excrétion urinaire des mêmes N-glycannes sialylés et O-glycosylpeptides de type mucine à noyau 1 mono- et bisialylés que ceux excrétés au cours de la sialidose (van Pelt *et al.*, 1991 ; Takahashi *et al.*, 1991).





## 3.1.2- La maladie de Morquio type B

La  $\beta$ -galactosidase lysosomale est une glycosidase catalysant la dégradation des glycosphingolipides, des N-glycannes de type hybride et de type complexe, et les O-glycannes de type mucine et de type protéoglycanne (GAG). Le déficit génétique en cet

enzyme affecte les patients souffrant de deux types de pathologies, la maladie de Morquio type B et la GM1-gangliosidose, qui représentent les deux extrêmes du spectre des phénotypes cliniques, résultant des mutations du gène de la  $\beta$ -galactosidase (Callahan, 1999). La maladie de Morquio type B, qui résulte d'un déficit modéré de l'activité de la  $\beta$ galactosidase, conduit à une surcharge lysosomale en chaînes de kératane-sulfates et en chaînes N- et O-glycanniques, tandis que la GM1-gangliosidose, plus sévère, est marqué par un déficit de plus de 95% de l'activité de la  $\beta$ -galactosidase et s'accompagne en plus d'une excrétion urinaire en une famille de glycosphingolipides, les gangliosides à GM1. Les structures majeures accumulées dans les urines et les tissus des patients sont des N-glycannes de type complexe (Michalski *et al.*, 1982). De plus, un N-glycanne possédant la séquence terminale Gal( $\beta$ 1-6)Gal( $\beta$ 1-4)GlcNAc-R a été retrouvé parmi les structures majeures accumulées dans les urines souffrant de la maladie de Morquio, suggérant que cette séquence existe au niveau des glycoprotéines matures, circulantes ou membranaires (Michalski *et al.*, 1991).

#### 3.1.3- La maladie de Sandhoff

Le catabolisme des N- et O-glycannes, comme les glycosphingolipides, est réalisé par les Nacétyl- $\beta$ -hexosaminidases A et B, deux isoenzymes dimériques, formés par l'association de deux sous-unités,  $\alpha$  et  $\beta$ , différant par la spécificité pour le substrat (Hepbildikler *et al.*, 2002). Le déficit génétique en l'une et/ou l'autre de ces deux isoenzymes affectent les patients souffrant de diverses GM2-gangliosidoses, dont la GM2-gangliosidose variant O, également appelée maladie de Sandhoff (Sandhoff & Christomanou, 1979). La maladie de Sandhoff résulte d'une mutation de la sous-unité  $\beta$  des deux isoenzymes et s'accompagne d'une importante surcharge lysosomale en N- et O-glycannes, et en gangliosides à GM2. Bien que les O-glycannes de type mucine et de type protéoglycanne renferment également des résidus de  $\beta$ -GlcNAc, le matériel glucidique accumulé dans les tissus et les urines des patients est constitué en majorité par des N-glycannes de type complexe partiellement dégradés (Ng-Ying-Kin & Wolfe, 1974 ; Strecker *et al.*, 1977 ; Warner *et al.*, 1985).

#### **3.1.4-** L'α-mannosidose

L'α-mannosidose résulte d'une déficience en LAMAN et constitue une pathologie très hétérogène, caractérisée par un spectre de phénotypes cliniques large, notamment influencé par des facteurs génétiques et environnementaux (Ockerman, 1967, Berg *et al.*, 1999). Les

patients souffrant de cette pathologie sont caractérisés par une importante excrétion urinaire en N-glycannes de type oligomannosidique (Norden *et al.*, 1973 ; Strecker *et al.*, 1976 ; van Halbeek *et al.*, 1980 ; Yamashita *et al.*, 1980 ; Matsuura *et al.*, 1981 ; Egge *et al.*, 1982). Hormis les phénotypes cliniques communs aux autres glycoprotéinoses, les patients souffrant d' $\alpha$ -mannosidose présentent des syndromes d'immunodéficiences, dues aux interactions des oligomannosides, présents en grande quantité dans le plasma sanguin, avec un certain nombre de molécules impliquées dans la réponse immunitaire, dont l'IL-2 (Zanetta *et al.*, 1998 ; Malm *et al.*, 2000). Enfin, l' $\alpha$ -mannosidose a également été décrite chez le bovin (Berg *et al.*, 1997 ; Tollersrud *et al.*, 1997), le chat (Berg *et al.*, 1997b) et le porc (Berg & Hopwood, 2002).

#### 3.1.5- La β-mannosidose

La β-mannosidose, causée par une déficience en β-mannosidase lysosomale, est moins fréquente et moins sévère que l'α-mannosidose (Percheron et al., 1992 ; Bedilu et al., 2002). Les patients souffrant de cette maladie sont caractérisés par une accumulation importante de Man( $\beta$ 1-4)GlcNAc (van Pelt *et al.*, 1990) et de sa forme sialvlée NeuAc( $\alpha$ 2-6)Man( $\beta$ 1-4)GlcNAc (van Pelt et al., 1990) dans les tissus et les urines. La présence du trisaccharide sialylé NeuAc(α2-6)Man(β1-4)GlcNAc, isolé de l'urine, résulte vraisemblablement d'une sialylation anormale de l'accumulat primaire Man( $\beta$ 1-4)GlcNAc, par une ( $\alpha$ 2-6)sialyltransférase golgienne, suite à la perte de compartimentation subcellulaire, au moment de la cytolyse. La β-mannosidose a également été décrite chez la chèvre (Jones & Dawson, 1981) et le bovin (Bryan et al., 1990). Chez ces espèces, caractérisées par l'absence de la N,N'diacétylchitobiase lysosomale, on retrouve l'équivalent trisaccharidique Man(B1-4)GlcNAc(β1-4)GlcNAc, comme accumulat principal, pouvant être accompagné de structures plus complexes, comme ce pentasaccharide  $Man(\beta 1-4)GlcNAc(\beta 1-4)Man(\beta 1-4)GlcNAc(\beta 1-4)GlcNAC($ 4)GlcNAc, isolé de l'urine de chèvre (Jones & Laine, 1981; Matsuura et al., 1983). Cependant, l'origine de cette structure pentasaccharidique, uniquement décrite chez la chèvre, est encore inconnue, et l'équivalent sialylé du trisaccharide Man(β1-4)GlcNAc(β1-4)GlcNAc n'a jamais été décrite chez ces deux espèces.

## 3.1.6- L'aspartylglucosaminurie

L'aspartylglucosaminurie est causée par une déficience en aspartyl-N-β-glucosaminidase, enzyme catalysant la rupture de liaison N-glycosidique des glycoasparagines, formées après

protéolyse complète des N-glycosylprotéines par les cathepsines (Pollitt et al., 1968 ; Pollitt & Jenner, 1969; Maury, 1982). Sa prévalence est particulièrement élevée en Finlande, mais reste relativement rare dans les autres régions du monde. La surcharge lysosomale causée par ce déficit conduit à une accumulation de la N-(N-acétyl-β-glucosaminyl)-asparagine GlcNAc(β1-N)Asn, et d'autres glycoasparagines plus complexes, constituées d'une séquence mono-, di-, tri- et tétralactosaminique de type 2 linéaire, mono- et disialylée, directement liée au résidu d'Asn, dans les tissus et l'urine des patients (Pollitt & Pretty, 1974 ; Sugahara et al., 1975, 1976 ; Irie et al., 1995). Ces glycoasparagines, caractérisées par l'absence de noyau N,N'diacétylchitobiose N-lié au résidu d'Asn, ne sont pas formées suite à la protéolyse complète des N-glycosylprotéines par les cathepsines, mais elles constituent des produits d'accumulation secondaires, probablement formés après action des glycosyltransférases golgiennes, libérées au cours de la cytolyse induite par l'accumulation massive en N-(Nacétyl-ß-glucosaminyl)-asparagine. Par ailleurs, un certain nombre de glycoasparagines, à noyau N,N'-diacétylchitobiose N-lié au résidu d'Asn, peuvent accompagner les structures précédentes et elles constituent des produits de digestion incomplète des glycoasparagines, formées après protéolyse complète des N-glycosylprotéines, par les exoglycosidases. C'est le cas de la glycoasparagine Man( $\alpha$ 1-6)Man( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-N)Asn, isolée du foie et de l'urine (Lundblad et al., 1976 ; Maury, 1979 ; Gordon et al., 1998).

## 3.1.7- La fucosidose

La fucosidose, une déficience en  $\alpha$ -fucosidase lysosomale, est également une glycoprotéinose très hétérogène, caractérisée par un spectre de phénotypes cliniques large, probablement dépendant de facteurs génétiques et environnementaux, et par une atteinte neurologique progressive et fatale (Durand *et al.*, 1969 ; Willems *et al.*, 1991). Les patients accumulent, dans leurs tissus et leurs urines, d'importantes quantités de N-glycannes, de glycoasparagines et de glycolipides fucosylés (Yamashita *et al.*, 1979, 1985 ; Strecker *et al.*, 1977, 1978 ; Nishigaki *et al.*, 1978 ; Michalski *et al.*, 1991). Les N-glycannes accumulés sont essentiellement de type complexe et possèdent des séquences terminales de type Lewis. Les glycoasparagines présentent toutes une ( $\alpha$ 1-6)-fucosylation sur les résidus de GlcNAc proximaux, et la structure Fuc( $\alpha$ 1-6)GlcNAc( $\beta$ 1-N)Asn constitue le produit d'accumulation majeur des urines et des tissus de patients. Leur présence s'explique par une inhibition stérique de l'aspartyl-N- $\beta$ -glucosaminidase par les résidus de Fuc liés en ( $\alpha$ 1-6) sur les résidus de GlcNAc proximaux. Enfin, ces glycoasparagines, partiellement dégradées par les autres exoglycosidases, sont en général tronquées de l'une des branches  $\alpha$ -mannosidiques du noyau pentasaccharidique, et présentent des antennes pouvant être a-, mono- ou bifucosylées.

#### 3.1.8- Les maladies de Schindler et de Kanzaki

La déficience en N-acétyl- $\alpha$ -galactosaminidase, également appelée  $\alpha$ -galactosidase B, affecte les patients souffrant de deux pathologies, les maladies de Schindler et de Kanzaki (van Diggelen et al., 1987; Kanzaki et al., 1989; Desnick & Wang, 1990; Desnick & Schindler, 2001 ; Sakuraba et al., 2004). Ces pathologies sont caractérisées par un spectre de phénotypes cliniques large et extrêmement variable d'un patient à l'autre. Les contradictions entre les génotypes et les phénotypes cliniques suggèrent néanmoins que d'autres facteurs, hormis le déficit génétique lui-même, influenceraient la variabilité des présentations cliniques des patients, particulièrement l'occurrence de symptômes neurologiques particulièrement sévères, comme la dystrophie neuroaxonale (Wolfe et al., 1995). Les patients, particulièrement ceux possédant le déterminant de groupe sanguin A, sont caractérisés par une surcharge lysosomale en N- et O-glycannes, en glycolipides terminés par des résidus d'α-GalNAc, et en Oglycosylpeptides de type mucine : GalNAc( $\alpha$ 1-O)Ser/Thr, NeuAc( $\alpha$ 2-3)Gal( $\beta$ 1-3)]GalNAc( $\alpha$ 1-O)Ser/Thr et NeuAc( $\alpha$ 2-6)[NeuAc( $\alpha$ 2-3)Gal( $\beta$ 1-3)]GalNAc( $\alpha$ 1-O)Ser/Thr-Pro (Desnick & Schindler, 2001). La présence de O-glycosylpeptides de type mucine s'expliquerait par le fait que la N-acétyl-a-galactosaminidase possède également une activité peptidyl-O-glycosidase, capable de cliver la liaison séryl-O-GalNAc. La présence des résidus de NeuAc et de Gal sur certains de ces glycopeptides tendent à montrer que la N-acétyl-agalactosaminidase interagirait avec le complexe multienzymatique ternaire  $\alpha$ -sialidase- $\beta$ galactosidase-cathepsine A pour exercer son activité de peptidyl-O-glycosidase, et, à la suite de quoi, les O-glycannes libérés seraient ensuite dégradés par le biais des activités αsialidasique et  $\beta$ -galactosidasique du complexe transitoire. Cette hypothèse est soutenue par le faite que ces O-glycosylpeptides sont de structures similaires à ceux observés, au cours de la sialidose et de la galactosialidose (van Pelt et al., 1988; Takahashi et al., 1991).

#### 3.2- Les mucopolysaccharidoses

Les mucopolysaccharidoses (MPS) regroupent dix déficits génétiques du catabolisme lysosomal des chaînes de GAG des protéoglycannes (Tableau 4) (Neufeld & Muenzer, 2001). Elles se transmettent toutes sur le mode autosomal récessif à l'exception de la maladie de Hunter, dont la transmission est liée au sexe. Ces déficits touchent soit une O-sulfatase (MPS)

II, MPS IIID, MPS IVA et MPS VI), soit une N-sulfatase (MPS IIIA), soit une exoglycosidase (MPS I, MPS IIIB, MPS IVB et MPS VII), soit une transférase non hydrolytique (MPS IIIC). Elles conduisent également à une excrétion urinaire en chaînes de GAG. Une excrétion urinaire en N-glycannes et en glycolipides est également observée au cours de la MPS IVB.

#### 4- Dépistage et typage des anomalies congénitales du catabolisme des glycoprotéines

Il n'existe pas, pour la plupart de ces pathologies, de signes cliniques pathognomoniques. Le dépistage de ces pathologies est essentiellement réalisé sur la base de critères histocytologiques, d'une part, et, biochimiques, d'autre part. En effet, l'examen ultrastructural des inclusions dans les cellules sanguines, provenant soit d'un frottis sanguin, soit d'un prélèvement de moelle osseuse, peut être d'une aide substantielle dans le dépistage de ces pathologies. Cependant, le typage de ces pathologies ne peut être réalisé que par des examens biochimiques poussés, réalisés sur des échantillons sanguins et urinaires. Des essais d'activité enzymatique peuvent, en effet, être réalisés sur les leucocytes, les fibroblastes cutanés ou encore les hépatocytes des patients atteints. Par ailleurs, le dépistage et le typage définitif de ces pathologies sont réalisés après analyse des oligosaccharides accumulés dans les urines des patients. A l'heure actuelle, le dépistage rapide des glycoprotéinoses est réalisé, en routine dans les laboratoires, par le profilage des oligosaccharides et des glycopeptides urinaires par chromatographie sur couche mince (CCM) sur gel de silice, suivi de leur révélation par réaction avec l'orcinol sulfurique (Fig. 17) (Humbel & Collart, 1975 ; Sewell, 1979 ; Meikle *et al.*, 2004).



Figure 17 : Profil chromatographique sur couche mince de l'oligosaccharidurie de sujets sains ( $T_1$  et  $T_2$ ) et de patients souffrant d'a-mannosidose ( $\alpha$ M), de  $\beta$ -mannosidose ( $\beta$ M), de la maladie de Sandhoff (SF), de fucosidose (F) et de sialidose (SI). Témoins de migration chromatographique : diglucoside (DP<sub>2</sub>) et heptaglucoside (DP<sub>7</sub>).

De plus, le profilage des oligosacchariduries normales et pathologiques a également été envisagé par HPLC (Kin & Wolfe, 1980 ; Hommes & Varghese, 1991 ; Peelen *et al.*, 1994) et par électrophorèse capillaire de zone ou en gel d'acrylamide couplée à une détection fluorimétrique (Starr *et al.*, 1996), plus sensibles et plus résolutives que la CCM, et qui offrent la possibilité de quantifications absolues et relatives des oligosaccharides. Une fois dépisté, le typage des glycoprotéinoses est envisagé par la caractérisation structurale des structures accumulées dans les urines par des méthodes chimiques, enzymatiques et spectrométriques (ces approches glycobioanalytiques seront développées dans le chapitre 3). Par ailleurs, ces pathologies peuvent néanmoins faire l'objet d'un dépistage anténatal, par la réalisation d'examens histocytologiques et d'essais d'activité enzymatique sur des cellules prélevées du liquide amniotique (amniocytes) et/ou des villosités choriales, et par la caractérisation du matériel glucidique excrété par le fœtus dans le liquide amniotique, par des microméthodes de glycomique, dès la neuvième semaine post-conceptionnelle (Lake *et al.*, 1998 ; Ramsay *et al.*, 2004). Enfin, le diagnostic final de ces anomalies congénitales sera confirmé par la recherche d'éventuelles mutations sur des gènes candidats.

## C-Les anomalies congénitales du métabolisme des acides sialiques

Tout comme pour les anomalies congénitales du catabolisme des glycoprotéines, les anomalies congénitales du métabolisme des acides sialiques, appelées sialuries, conduisent à une accumulation en NeuAc, et/ou autres intermédiaires de biosynthèse, au niveau de la cellule. Comme nous le verrons, la surcharge en NeuAc peut avoir lieu soit au niveau du cytoplasme, soit au niveau du lysosome. Dans les deux cas de figures, ces surchages cellulaires évoluent finalement en l'excretion de NeuAc (et/ou autres intermédiaires de biosynthèse) dans les urines des patients. Ainsi, les méthodologies de glycomique développées pour l'étude des glycoprotéinoses, au cours de notre thèse, ont pu être appliquées à l'étude des sialuries.

## 1- Le métabolisme de l'acide sialique

Le NeuAc, constituant l'extrémité terminale réductrice des N-glycannes de type complexe et de certains types de O-glycannes, peut être soit recyclé à la suite de la dégradation lysosomale des glycoprotéines extracellulaires, soit synthétisé au niveau du cytoplasme à partir de la GlcNAc (Fig. 18). En effet, la synthèse de l'acide NeuAc débute par l'action de l'UDP-GlcNAc 2-épimérase/ManNAc kinase (GNE/MNK), un enzyme allostérique bifonctionnel qui

catalyse la conversion de l'UDP-GlcNAc en ManNAc-6-P et est rétroinhibé par le CMP-NeuAc. Pour ce faire, la première étape consiste en une réaction d'épimérisation en position 2 pour donner le ManNAc, après formation d'un premier intermédiaire, issu de la dénucléotidylation de l'UDP-GlcNAc : le 2-acétamidoglucal. Le ManNAc formé est immédiatement phosphorylé en position 6 pour donner le ManNAc-6-P, puis condensé au phosphoènolpyruvate (PEP), grâce à la NeuAc-9-P synthase. Le NeuAc est enfin formé par déphosphorylation du NeuAc-9-P, suivie de sa nucléotidylation en présence de CTP, pour former le CMP-NeuAc qui sera utilisé par les sialyltransférases golgiennes.



Figure 18 : Schéma de la biosynthèse cytoplasmique et nucléaire du CMP-NeuAc

# 2 - Les sialuries

## 2.1- La sialurie type français

La sialurie type français (OMIM 269921) doit son nom au premier cas mondial de sialurie, décrit en France par Montreuil *et al.* et Fontaine *et al.* (1968), chez un patient présentant une excrétion urinaire en NeuAc libre dix milles fois supérieure à la normale. Dans leur ensemble, les patients sont caractérisés par un retard psychomoteur modéré, une légère dysmorphie faciale ainsi qu'une hépatomégalie modérée. L'examen microscopique des fibroblastes du premier cas de sialurie n'a mis en évidence aucune anomalie morphologique au niveau des organites cellulaires, excluant la nature thésaurismosique de la maladie (Thomas *et al.*, 1989). En fait, la sialurie type français résulte d'un défaut de rétroinhibition allostérique de la GNE par le CMP-NeuAc, qui est la conséquence d'une mutation au niveau du site allostérique de

l'enzyme (Fig. 16) (Kamerling *et al.*, 1979; Seppala *et al.*, 1999). De plus, la nature hétérozygote des allèles mutants suggère un mode de transmission de type autosomal dominant.

#### 2.2- La sialurie type Salla (ou type finlandais) et ses formes sévères

C'est en 1979 qu'Aula et al. décrivent les premiers cas de sialurie, causée par une surcharge lysosomale en NeuAc. Les patients étaient caractérisés par un sévère retard psychomoteur et une ataxie associés à une excrétion urinaire en NeuAc libre, plus modérée que dans le cas de la sialurie type français (taux dix fois supérieur à la normale). Cette pathologie doit son nom à la ville dont sont originaires les premiers cas, Salla, une ville située au Nord-Est de la Finlande où la maladie y est très fréquente. Plus tard, une forme plus sévère de la maladie de Salla, baptisée « infantile sialic acid storage disease » (ISSD), a été décrite chez deux nouveaux nés, caractérisés par un sévère retard psychomoteur, une ataxie cérébelleuse, une hépatosplénomégalie ainsi qu'une dysmorphie faciale associés à une excrétion urinaire massive en NeuAc (taux deux cents fois supérieur à la normale) (Tondeur et al., 1982). L'examen microscopique des fibroblastes de patients atteint de la forme sévère de la maladie de Salla a révélé une surcharge anormale au niveau d'inclusions intracellulaires, caractéristiques des pathologies de surcharge lysosomale (Thomas et al., 1989). Depuis, il a été montré que la maladie de Salla, ainsi que ses formes sévères (ISSD), résultent d'une anomalie génétique, à transmission autosomale récessive, du transport de NeuAc libre du lysosome vers le cytoplasme, assuré par la sialine (Verheijen et al., 1999).

## 2.3- Dépistage et typage des sialuries

Le dépistage de la maladie de Salla et de ses formes sévères (ISSD) est basé sur les présentations cliniques des patients, sur la recherche de lysosomes hypertrophiés dans les tissus et sur le dosage du NeuAc libre urinaire, tandis que celui de la sialurie type français est uniquement basé sur le dosage du NeuAc libre. La quantification du NeuAc libre urinaire, ou issu de cultures de fibroblastes cutanés, peut être réalisé par le dosage du chromophore formé par réaction avec l'acide thiobarbiturique (Warren, 1959 ; Skoza & Mohos, 1976 ; Paschke *et al.*, 1992), ou par des approches chromatographiques, telles que l'HPLC (Seppala *et al.*, 1991) ou encore la chromatographie en phase gazeuse couplée à une détection par spectrométrie de masse (GC-MS) (Stankovics *et al.*, 1997), plus modernes, plus précises et plus sensibles.

# CHAPITRE III :

# LES APPROCHES SPECTROMETRIQUES DE GLYCOMIQUE

A-Introduction	
B-Généralités sur la spectrométrie de masse	
1-Les sources d'ionisation	80
2-Les analyseurs	82
3-La spectrométrie de masse en tandem	
C-Les différentes approches spectrométriques de glycomique	85
1-L'analyse glycomique de glycoprotéines entières	85
2-L'analyse glycomique de glycopeptides protéolytiques	
2.1-Préparation des glycopeptides	
2.2-Profilage et caractérisation des N- et O-glycomes par site et identification des	sites de
glycosylation	89
2.3-Analyse des glycopeptides par MS	89
3-L'analyse glycomique des chaînes glycanniques libérées	
3.1-Libération des glycannes	
3.2-Profilages chromatographiques et électrophorétiques des N- et O-glycomes	
3.2-Profilage et caractérisation des N- et O-glycomes des glycoprotéines par MS	
3.2.1-Profilage des N- et O-glycomes des glycoprotéines par MS	
3.2.2-Caractérisation de la structure primaire des glycannes par MS	
3.2.2.1-Séquençage et localisation des points de branchement des glycannes par MS	96
3.2.2.2-Positionnement des liaisons interglycosidiques par MS.	99

#### **A-Introduction**

Au cours des dernières décennies, des efforts considérables ont été réalisés dans la compréhension des rôles, au combien nombreux, joués par les glycannes des glycoprotéines dans les systèmes biologiques. Leur implication dans la pathogénèse d'un certain nombre de processus pathologiques, tels que les cancers, les maladies inflammatoires chroniques, ou encore la cirrhose hépatique, a suscité l'intérêt croissant des biologistes et des cliniciens. Ainsi, au cours de ces pathologies, une altération des profils de glycosylation des protéines est à l'origine d'une fonction biologique déclinante, et les glycoformes anormales peuvent, en conséquence, constituer de précieux glycobiomarqueurs diagnostiques et/ou pronostiques spécifiques de ces maladies. Toutes ces données ont conduit à la naissance d'une nouvelle science holistique, la glycomique, dont la mission consiste en le développement d'approches et d'outils analytiques globaux dédiés au profilage et à la caractérisation structurale de l'ensemble des chaînes glycanniques liées aux protéines, exprimées dans un type cellulaire donné, à un instant donné et dans des conditions de développement données. Dans le cadre de la glycomique fonctionnelle, ces approches et outils glycobioanalytiques doivent pouvoir renseigner sur les implications biologiques et pathologiques des glycannes de glycoprotéines d'intérêt, comme les glycoprotéines plasmatiques. Ces approches peuvent être appliquées à l'étude du glycome d'une glycoprotéine purifiée ou d'un mélange de glycoprotéines exprimées dans un tissu ou un fluide biologique particulier. Cependant, le profilage et la caractérisation complète d'un glycome restent, encore à l'heure actuelle, un important challenge pour les bioanalystes. La caractérisation structurale des glycannes consiste, en effet, en la détermination de chacune des caractéristiques suivantes : la masse moléculaire, la composition en monosaccharides, la séquence primaire en monosaccharides et la configuration des carbones anomériques, la présence et la localisation des points de branchement, et la position des liaisons interglycosidiques. De plus, dans le cas d'une glycoprotéine purifiée, la stratégie de glycomique permet également d'établir la localisation et la microhétérogénéité glycannique des sites de glycosylation. Dans le domaine de la glycomique, la spectrométrie de masse (MS) s'est imposée comme l'outil analytique le plus puissant pour le profilage et le séquençage des glycannes avec une importante sensibilité et une haute résolution (Harvey, 2005; Metchref & Novotny, 2002; Zaia, 2004; Geyer & Geyer, 2006; Morelle et al., 2006). A cet égard, nous consacrerons, dans un premier temps, une présentation sommaire de la MS et de son potentiel dans la caractérisation des biomolécules, en particulier des glycannes, puis, dans un second temps, les principales

stratégies de glycomique, basées sur la MS, dédiées au dépistage de pathologies associées à des modifications des profils de glycosylation, d'une part, et à la caractérisation de la structure détaillée des chaînes glycanniques de glycoprotéines d'intérêt, d'autre part.

# B- Généralités sur la spectrométrie de masse

Le principe de la spectrométrie de masse (MS) repose sur le déplacement de particules chargées dans des champs électromagnétiques, sous un vide poussé. Elle consiste en la détermination de rapports masse/charge (m/z), exprimés en Thomson (Th), d'ions en phase gazeuse. Pour ce faire, les analytes doivent, au préalable, être ionisés et vaporisés. Schématiquement, un spectromètre de masse se compose de quatre composantes (Fig. 19) :

- un système d'introduction de l'échantillon, pouvant être la sortie d'une chaîne de chromatographie liquide (LC), de chromatographie en phase gazeuse (GC), ou encore d'électrophorèse capillaire (CE);
- une source d'ionisation, qui permet l'ionisation de l'analyte vaporisé ;
- un analyseur, qui permet la séparation des ions, générés dans la source, en fonction de leur rapport m/z ;
- un détecteur, qui permet la mesure de l'intensité du signal, correspondant à une valeur m/z.



Figure 19 : Schéma simplifié de la structure et du fonctionnement d'un spectromètre de masse.

#### 1- Les sources d'ionisation

La source d'ionisation a une double fonctionnalité : formation d'un faisceau d'ions représentatif de l'échantillon, suivie de l'accélération des ions formés, par des champs électromagnétiques, vers l'analyseur. Jusqu'aux années 80, l'ionisation des molécules était réalisée par des sources d'ionisation de type impact électronique (EI) et de type ionisation chimique (CI) (Tableau 5). Ces techniques sont, cependant, limitées à l'analyse de composés organiques apolaires volatiles thermorésistants de faible masse moléculaire (< 1.2 kDa), et conduisent à une série de fragmentations des analytes, permettant l'obtention d'informations structurales, soit par des processus de collisions très énergétiques (EI) ou soit par instabilité chimique (CI). Les biomolécules, composés bioorganiques polaires thermolabiles de haute masse moléculaire, ne peuvent donc pas être ionisées par ces méthodes. La plus grande révolution a été, vers la fin des années 80, l'introduction de deux principales méthodes d'ionisation, dite douce, la technique d'ionisation et de désorption laser assistée par matrice (MALDI) (Karas & Hillenkamp, 1988) et la technique d'électrospray (ESI) (Fenn et al., 1989). Les techniques d'ionisation ESI et MALDI permettent l'analyse de macromolécules biologiques intactes et ont ouvert de nouvelles perspectives dans la caractérisation des biomolécules.

L'ESI produit un plasma d'ions en phase gazeuse, par désorption des analytes en solution sous l'effet d'un champ électrique intense (3-5 kV), rendant possible le couplage de cette méthode d'ionisation avec des sorties de LC ou de CE. La technique MALDI, quant à elle, permet la désorption et l'ionisation d'analytes en phase condensée, préalablement cocristallisés en présence d'une matrice cristalline aromatique, sur une surface métallique (la cible), sous l'effet d'une irradiation pulsée par un laser (UV). Les principales caractéristiques techniques de ces méthodes sont résumées dans le tableau 5. Ces sources d'ionisation présentent le grand avantage de générer des signaux correspondant à des espèces moléculaires, avec très peu de fragmentation, livrant ainsi les masses moléculaires des différents composés présents dans l'échantillon. L'ionisation MALDI présenten néanmoins l'avantage de générer des ions moléculaires principalement monochargés, tandis que l'ionisation ESI génère des ions moléculaires multichargés, pouvant compliquer l'interprétation des spectres de masse. La sensibilité de ces sources d'ionisation, en particulier celle de la source ESI, peut être considérablement altérée par la présence de sels dans l'échantillon, d'où la nécessité d'inclure une étape de dessalage, avant son analyse MS.

## Tableau 5 : Les principales sources d'ionisation utilisées dans les analyses de glycomique

AVANTAGES	INCONVENIENTS			
Ionisation des analytes volatiles				
Ionisation par impact électronique (EI)				
- Ionisation des molécules strictement volatiles	- Echantillons obligatoirement volatiles et			
	thermostables			
- Spectres de masse reproductibles	- Ionisation limitée aux molécules de masse < 1,2 kDa			
- Informations structurales par la tragmentation	- Absence d lons moleculaires			
Sonsibilitá importanto (fmolo)				
- Possibilité de constituer une librairie pour				
l'identification des analytes				
- Couplage possible avec la GC				
Ionisation chimiaue (CI)				
- Ionisation des molécules strictement volatiles	- Echantillons obligatoirement volatiles et			
	thermostables			
- Spectres de masse simples	- Ionisation de molécules de masse < 1,2 kDa			
- Spectres d'ions moléculaires	- Pas d'informations structurales			
- Sensibilité importante (qq fmoles)	- Absence de librairies pour l'identification des			
- Couplage possible avec la GC	analytes			
Ionisation des analytes non volatiles				
Ionisation par « electrospray » (ESI)				
- Ionisation de molécules de masses < 250 kDa	- Formation d'espèces multichargées compliquant les			
	spectres de masse			
- Sensible (qq pmoles)	- Faible tolerance aux sels/contaminants			
- Methode d'ionisation de complexes non covalents				
- Couplage possible avec l'HPLC (Débit : 1-2000				
uL/min)				
Ionisation par nano-ESI				
- Efficacité d'ionisation 500 fois plus élevée	- Fragilité du capillaire			
- Sensibilité importante (qq fmoles)	- Utilisation d'un nouveau capillaire pour chaque			
- Couplage possible avec la nano-HPLC (Débit : 10-	analyse			
1000 nL/min)				
- Meilleure tolérance aux sels/contaminants				
Ionisation par « matrix-assisted laser desorption /ionization » (MALDI)				
- Très grande sensibilité (qq amoles à qq fmoles)	- Couplage LC-MS impossible (off-line)			
- Ionisation de molécules de masse < 500 kDa	- Interférence par la matrice			
- Excellente tolérance aux sels/contaminants	- Fragmentation en source des ions analytes			
- Automatisable/analyses rapides et a haut débit				
- Fragmentation haute énergie				

Cependant, le développement de sources nano-ESI, utilisant de très faibles débits (< 1000 nL/min), a contribué à une incroyable augmentation de la sensibilité, de l'efficacité d'ionisation, et de la tolérance aux sels, d'une part, et à diminuer la quantité d'analyte pour l'analyse, d'autre part (Wilm & Mann, 1996). Enfin, quelle que soit la méthode MS utilisée, les analytes sont détectés, sur le spectre de masse, sous la forme d'une distribution de signaux d'ions moléculaires isotopiques, caractérisés par la présence d'un certain nombre d'isotopes des atomes les moins abondants de la nature ( $^{13}C$ ,  $^{2}H$ ,  $^{34}S$  ...). La masse monoisotopique

correspond à la masse de l'ion moléculaire de plus faible rapport m/z, au sein de la distribution de pics isotopiques, n'étant constitué que par les isotopes des atomes les plus abondants dans la nature. Le nombre et l'abondance des pics isotopiques augmentent avec la masse moléculaire de l'analyte, jusqu'à former, dans le cas des macromolécules, d'imposants massifs de pics isotopiques non résolus. La possibilité, pour l'ionisation ESI, de générer des espèces moléculaires multichargées, lui confère la propriété de fournir une mesure très précise des masses de composés de taille importante, tels que des glycopeptides ou des glycoprotéines, alors détectés avec de très faibles rapports m/z. Les ions produits par les sources MALDI et ESI, peuvent être formés soit par protonation/déprotonation de sites basiques/acides [M+nH]<sup>n+</sup>/[M-nH]<sup>n-</sup> (protéines, peptides), soit par complexation avec des adduits métalliques alcalins monovalents, tels que le sodium (Na) [M+nNa]<sup>n+</sup>, [M-nH+(n+m)Na]<sup>m+</sup> (oligosaccharides), et ils seront dits pseudomoléculaires.

## 2- Les analyseurs

Une grande variété d'analyseurs peut être couplée aux sources d'ionisation ESI et MALDI. Les paramètres instrumentaux nécessaires à l'évaluation de leur performance et de leur utilité sont la résolution, la précision en masse, la gamme de masse et la sensibilité (Tableau 6). A l'heure actuelle, quatre types d'analyseurs sont communément utilisés dans des approches de glycomique : l'analyseur quadrupolaire (Q), l'analyseur en temps de vol (TOF), l'analyseur en trappe ionique quadrupolaire (linéaire ou tridimensionnelle, IT) et l'analyseur par résonance cyclotronique d'ions à transformée de Fourier (FTICR). Les principales caractéristiques instrumentales de ces analyseurs sont résumées dans le tableau 6.

Cependant, la compatibilité de ces analyseurs avec les sources ESI ou MALDI varie. Il existe deux analyseurs communément couplés avec la source MALDI, et se caractérisant par la formation d'un faisceau discontinu d'ions moléculaires : les analyseurs TOF et FTICR. L'analyseur TOF est, à l'heure actuelle, l'analyseur le plus répandu sur les instruments équipés d'une source MALDI. Malgré la sophistication et l'incroyable résolution ( $3x10^6$ ) des analyseurs FTICR, ils demeurent néanmoins très onéreux.

	ANALYSEURS SPATIAUX		ANALYSEURS TEMPORELS	
	Quadrupole (Q)	Temps de vol (TOF)	Trappe ionique quadrupolaire (IT)	Résonance cyclotronique des ions à transformée de Fourier (FTICR)
Faisceau d'ions	Continu	Pulsé	Pulsé	Pulsé
Principe de la séparation	Séparation des ions selon la stabilité des trajectoires dans un champ quadrupolaire linéaire de radio- fréquence	Dispersion temporelle d'un faisceau ionique pulsé suivie d'une séparation selon le temps de vol	Ions piégés. Séparation des ions selon la stabilité des trajectoires dans un champ quadrupolaire tridimensionnel (ou linéaire) de radio- fréquence	Ions piégés. Séparation des ions selon la fréquence cyclotronique (force de Lorenz) dans un champ magnétique
m/z	$k(V/\omega^2 r^2)$	$(2t^{2}V)/L^{2}$	$k(V/\omega^2 r^2)$	<b>B</b> /2πω
Résolution	$> 10^{3}$	$> 10^{3}$ (mode linéaire) $> 10^{4}$ (mode réflectron)	> 10 <sup>3</sup>	> 10 <sup>6</sup>
Avantages	-Très adapté pour le couplage à une source ESI	-Gamme de masse très large -Balayage des ions très rapide -Couplage avec une source MALDI excellente	Possibilité de réaliser des expériences $MS^n$ (n = 2-6)	-Possibilité de réaliser des expériences MS <sup>4</sup> -Très haute résolution
Inconvénients	Limite supérieure en masse faible (4 kDa)	Nécessite l'emploi d'une source d'ionisation pulsée (MALDI)	Gamme de masse limitée	-Champs magnétiques très élevés -Encombrant

# Tableau 6 : Les principaux analyseurs utilisés dans les analyses de glycomique

V = tension accélératrice, B = intensité du champ magnétique, r = rayon, t = temps, L = longeur du tube TOF,  $\omega$ = fréquence

La résolution et la précision en masse des spectromètres équipés d'un analyseur TOF ont été considérablement améliorées, particulièrement avec le développement de la technique d'extraction retardée, qui réduit le nombre et l'énergie des collisions, qui ont lieu dans la source MALDI, et avec l'introduction de réflecteurs électrostatiques ou réflectron, qui refocalisent en énergie cinétique les ions durant leur vol. Ces derniers développements permettent aux spectromètres MALDI-TOF de détecter quelques attomoles (amoles) de peptides avec une précision en masse de l'ordre de quelques dizaines de ppm.

#### 3- La spectrométrie de masse en tandem

Les spectromètres de masse en tandem peuvent être utilisés en combinant deux ou plusieurs analyseurs, dans diverses configurations, lors d'expériences MS/MS, permettant ainsi l'obtention d'informations structurales.



Figure 20 : Schéma simplifié de la structure et du fonctionnement d'un spectromètre de masse à deux analyseurs en tandem.

Le principe de la MS/MS repose sur la sélection d'ions moléculaires précurseurs, à une valeur de m/z donnée (+/-  $\delta$ m/z), à l'aide du premier analyseur, suivie de sa décomposition (fragmentation) en ions fragments (ions fils), analysés dans le second analyseur (Fig. 20). Les ions précurseurs et les ions fragments peuvent être séparés dans l'espace, en combinant deux analyseurs du même type ou de géométrie hybride, ou dans le temps, en réalisant plusieurs étapes de sélection/fragmentation, en utilisant un même analyseur, qui fonctionne comme un piège ionique. En fonction du type d'analyseur utilisé, il existe plusieurs méthodes pour le transfert d'énergie interne aux ions moléculaires précurseurs pour induire leur décomposition. La première méthode, la plus communément utilisée, consiste en l'introduction, entre deux analyseurs spatiaux, d'une cellule de collision, renfermant un gaz inerte sous pression (argon ou diazote), avec lequel les ions moléculaires sélectionnés entrent en collision (CID) (Fig. 20). L'analyseur triple quadrupolaire (Q<sub>1</sub>qQ<sub>2</sub>), couplé à une source d'ionisation ESI, est l'un des analyseurs les plus utilisés, lors d'expériences MS/MS. D'autres analyseurs, de géométrie

hybride, cette fois, peuvent être conçus, afin de combiner les caractéristiques spécifiques de chacun des analyseurs pour des analyses MS/MS de qualité supérieure. C'est le cas, par exemple, des analyseurs en tandem hybride Q/TOF (Morris et al., 1997) et Q/LIT (Sandra et al., 2004), généralement couplés à une source de nano-ESI, qui associent un filtre de masse quadrupolaire (Q), pour la sélection d'ions précurseurs, à un analyseur de meilleur résolution, respectivement le TOF et le LIT (trappe ionique quadrupolaire linéaire), pour l'analyse des ions fragments. Par ailleurs, des expériences de MS en tandem, permettant la réalisation de n étapes de sélection/fragmentation ( $MS^n$ ; n < 6, IT/ n < 4, FTICR), peuvent être conduites en n'utilisant qu'un seul des analyseurs temporels, grâce à leur capacité à piéger les ions moléculaires d'intérêt à une valeur de m/z donnée (les autres ions moléculaires étant éjectés de l'analyseur). Ainsi, les ions piégés dans les analyseurs IT et FTICR sont ensuite fragmentés par collision avec soit des molécules de gaz neutre, en mode CID, soit des électrons de faible énergie, en mode « electron capture dissociation » (ECD), sur les analyseurs FTICR, ou en mode « electron transfert dissociation » (ETD), sur les analyseurs IT. Les ions fragments, générés dans ces pièges ioniques, sont enfin analysés par ces mêmes analyseurs, et, si on le souhaite, l'expérience peut ainsi être répétée, en ne piégeant dans l'analyseur que les ions fragments à un rapport m/z donné, puis de les soumettre, à nouveau, à une fragmentation. Comme nous le verrons, quelle que soit la méthode MS en tandem utilisée, la fragmentation des peptides et des glycannes se localise préférentiellement au niveau des liaisons peptidiques et des liaisons interglycosidiques, respectivement. L'analyse des incréments de masse entre le rapport m/z des ions fragments permet, dans la majorité des cas, de déterminer la séquence primaire en acides aminés ou en monosaccharides des peptides ou des oligosaccharides, respectivement.

## C- Les différentes approches spectrométriques de glycomique

#### 1- L'analyse glycomique de glycoprotéines entières

Il existe plusieurs méthodes, basées sur l'utilisation de techniques électrophorétiques (CE, PAGE) et MS, permettant de déterminer la présence et la structure des chaînes glycanniques sur des glycoprotéines en mélange complexe, enrichies par chromatographie d'affinité sur colonnes de lectines immobilisées, ou encore purifiées. Le profilage des glycoformes des glycoprotéines peut également être réalisé par SDS-PAGE, par 2D-PAGE, ou encore par CE couplée à une détection UV ou MS, plus sensible, plus rapide et plus résolutive (Haselberg *et al.*, 2007). Les glycoprotéines peuvent, en effet, être séparées par SDS-/2D-PAGE,
électrotransférées sur membrane, puis la nature des glycannes des glycoformes est déterminée par l'emploi de lectines spécifiques (Haselbeck & Hösel, 1993 ; Cummings, 1994). Les glycoformes, séparées par SDS-/2D-PAGE, peuvent également être N- ou O-déglycosylées dans le gel d'acrylamide (Küster *et al.*, 1997, 2001 ; Taylor *et al.*, 2006). Le profilage des glycannes extraits et purifiés, comme nous le verrons, peut être réalisé, après une étape facultative de couplage à un fluorophore (Lamari *et al.*, 2003), par des approches séparatives telles que l'HPLC (Rudd *et al.*, 2001), l'électrophorèse en gel d'acrylamide (Starr *et al.*, 1996) ou encore la CE (Oefner & Chiesa, 1994) couplées à une détection en fluorescence ou en MS. La caractérisation des glycannes peut également être conduit par l'emploi de diverses combinaisons d'exo- et endoglycosidases sur les glycoprotéines, suivi du profilage des glycoformes digérées par SDS-/2D-PAGE ou encore par CE.

Le profilage, de même que la caractérisation de l'ensemble des glycoformes de glycoprotéines, peut également être envisagé par MALDI-MS et par ESI-MS (Harvey, 2005). Lorsque la séquence primaire des glycoprotéines est connue dans les banques de données protéiques, la composition en monosaccharides, en termes d'Hex, d'HexNAc, de NeuAc et de dHex, de chaque glycoforme glycoprotéinique peut ainsi être aisément déterminée. La structure primaire des glycannes peut également être confirmée par l'emploi de diverses combinaisons d'exo- et d'endoglycosidases sur les glycoprotéines, suivi du profilage des glycoformes digérées par MALDI-MS ou ESI-MS. L'analyse des glycoprotéines, particulièrement celles de plus de 40 kDa, par MALDI-MS, présente l'inconvénient de donner d'importants massifs de pics isotopiques non résolus, rendant le profilage de leur glycome difficile et imprécis, hormis dans le cas de l'utilisation de spectromètres de masse équipés d'une source ESI et/ou d'un analyseur FTICR ultrarésolutif. De plus, la caractérisation structurale fine des glycannes, encore liés aux glycoprotéines, ne peut être complètement conduite.

# 2- L'analyse glycomique des glycopeptides protéolytiques

Le profilage complet, de même que la caractérisation structurale du glycome d'une glycoprotéine, peut être conduit par l'analyse glycomique de glycopeptides générés par sa protéolyse enzymatique (Fig. 21). En effet, l'intérêt de l'étude des glycopeptides protéasiques d'une glycoprotéine est de générer des glycopeptides portant chacun un site de glycosylation, et des informations concernant la localisation, la microhétérogénéité et l'occupation des sites de glycosylation peuvent ainsi être obtenues.

## 2.1- Préparation des glycopeptides

Les glycopeptides sont générés par la digestion des glycoprotéines d'intérêt par une endoprotéase, telle que la trypsine, endoprotéase standard la plus communément utilisée, la chymotrypsine, la thermolysine et bien d'autres encore. Le choix de l'enzyme dépend notamment de sa capacité à générer des glycopeptides qui ne renferment qu'un site de glycosylation, préférentiellement localisé en milieu de chaîne, sous réserve de connaître la séquence en acides aminés des analytes glycoprotéiniques. La protéolyse enzymatique des glycoprotéines nécessite, par ailleurs, qu'elles soient complètement déstructurées, pour maximiser l'activité catalytique de l'enzyme choisi. La déstructuration des glycoprotéines consiste en leur dénaturation, en présence d'une solution hyperosmolaire d'un agent chaotropique, suivie de la réduction de leurs ponts disulfures puis de la S-alkylation des groupements sulfhydriles libres. Il convient d'indiquer que les glycoprotéines d'intérêt, réduites, alkylées et séparées par SDS-/2D PAGE.



Figure 21 : Stratégie générale employée pour l'analyse glycomique des glycopeptides

Les glycopeptides ne constituent qu'une faible part du mélange de peptides totaux, et, à cause de la microhétérogénéité par site, sont détectés avec une faible sensibilité par MS. De plus, la distinction des peptides glycosylés de peptides non glycosylés est rendue difficile par le phénomène de suppression du signal des glycopeptides, particulièrement ceux portant des

glycannes sialylés, en présence de peptides non glycosylés (Annesley, 2003). Afin de circonvenir à ces inconvénients, le développement de procédés chromatographiques, dédiés à l'enrichissement en glycopeptides, a été conduit. En effet, les glycopeptides peuvent être sélectivement purifiés par chromatographie d'affinité sur lectines immobilisées, sous réserve de connaître la nature des glycannes majeurs, portées par la glycoprotéine d'intérêt (Geng et al., 2001; Hirabayashi, 2004). La capture des glycopeptides par des lectines présente l'avantage de préserver l'intégrité structurale de la partie glycannique, mais, compte tenu de leur spécificité restreinte à certaines structures, elles ne permettent pas toujours d'isoler l'ensemble des glycoformes, nécessaires au profilage complet des glycomes par site. Ainsi, une autre méthode d'enrichissement des glycopeptides, par chromatographie d'interaction hydrophile (HILIC), a été développée (Hägglund et al., 2004). Enfin, un certain nombre d'approches chimio-enzymatiques, basées sur la modification chimique des glycannes des glycoprotéines, ont été élaborées pour maximiser les taux d'identification des sites de glycosylation, mais présentent les inconvénients de ne pas permettre le profilage et la caractérisation des glycomes par site. Par exemple, la méthode chimio-enzymatique, développée par Zhang et al. (2003), pour l'identification des sites de N-glycosylation, consiste en l'oxydation periodique des glycannes des glycoprotéines, suivie de leur couplage à des billes d'hydrazine, qui permettent leur capture et leur enrichissement. Après protéolyse enzymatique, les glycopeptides couplés aux billes sont enrichis, puis les glycannes libérés après action de la PNGase F. Les aglycones peptidiques sont enfin caractérisés par des approches MS. Rademaker et al. (1998) et Hanisch et al. (2001) ont élaboré des méthodes de marquage spécifique par alkylamination des sites de O-glycosylation de glycoprotéines séparées par PAGE, puis successivement O-déglycosylées, par β-élimination, et protéolysées, dans le gel d'acrylamide. La caractérisation spectrométrique des peptides «O-modifiés» purifiés permet de déterminer le nombre et la localisation des sites initialement O-glycosylés.

Le mélange de glycopeptides, enrichis par chromatographie d'affinité sur lectines ou par HILIC, est enfin fractionné par HPLC en phase inverse (RP) ou, depuis peu, par HPLC en phase normale (NP) (Wuhrer *et al.*, 2005). L'identification des fractions glycopeptidiques peut être confirmée par comparaison des profils HPLC, obtenus avant et après déglycosylation enzymatique ou chimique du mélange de glycopeptides, ou par leur analyse MS.

# 2.2- Profilage et caractérisation des N- et O-glycomes par site et identification des sites de glycosylation

L'identification de fractions glycopeptidiques, ainsi que le profilage du glycome par site de glycosylation peuvent être confirmés par l'analyse MALDI-MS de chacune d'entre elles, avant et après une N-déglycosylation enzymatique. La N-déglycosylation des glycopeptides, par la PNGase F, la N-glycosidase la plus communément utilisée en glycomique, suivie d'une analyse MS, permet de confirmer la présence de N-glycosylpeptides et de les différencier des O-glycosylpeptides. De plus, la séquence primaire des glycannes de chacune des glycoformes, profilées par MALDI-MS, peut être confirmée par des digestions exoglycosidasiques séquentielles sur cible MALDI (Mechref & Novotny, 1998). Enfin, le séquençage comme le positionnement des points de branchement des O-glycannes des O-glycosylpeptides peuvent également être déterminés par leur analyse en CID-MS/MS.

L'analyse MS de la masse des aglycones peptidiques, formés après N-déglycosylation des glycopeptides, permet également d'identifier les peptides porteurs des sites de glycosylation, en confrontant les masses observées aux masses théoriques des peptides, formés par protéolyse in silico de la glycoprotéine, lorsqu'elle est connue dans les banques de données protéiques. La particularité de la PNGase F est de marquer les sites de N-glycosylation, en convertissant les résidus d'Asn en résidus d'Asp, conduisant à un accroissement de la masse des peptides de 1 Da. De plus, la N-déglycosylation enzymatique, réalisée en présence de H2<sup>18</sup>O, conduit à un marquage isotopique des résidus d'Asp néoformés, pouvant également aider à la localisation des sites de N-glycosylation par MS (Küster & Mann, 1999). Ainsi, par une simple analyse MS, il est possible de dénombrer les sites initialement N-glycosylés et de les différencier de ceux qui ne l'étaient pas. L'identification des sites de N-glycosylation peut être aisément confirmée par le séquençage en CID-MS/MS des aglycones peptidiques. Comme nous le verrons, l'identification des sites de glycosylation peut être réalisée par l'analyse des glycopeptides intacts par des techniques spectrométriques modernes, telles que l'ECD-MS/MS ou l'ETD-MS/MS, qui présentent l'avantage de focaliser la fragmentation préférentiellement sur l'axe peptidique, sans affecter les glycannes. Enfin, en plus de permettre le séquençage et la localisation des points de branchement des O-glycannes, l'analyse CID-MS/MS des O-glycosylpeptides intacts permet, dans bien des cas, un séquençage complet de la partie peptidique et, donc, l'identification des sites de O- glycosylation (Hanisch et al., 1998; Alving et al., 1999; Peter-Kataliníc, 2005; Morelle et al., 2006).

## 2.3- Analyse des glycopeptides par MS

La caractérisation spectrométrique des glycopeptides peut être conduite par de nombreuses techniques MS. Quelle que soit la méthode utilisée, l'analyse MS d'un glycopeptide natif, permet de profiler le glycome entier sur chaque site de glycosylation, puisque chaque ion moléculaire, détecté en mode positif sous la forme [M+nH]<sup>n+</sup> et [M+nNa]<sup>n+</sup>, correspond à une glycoforme du peptide. Ainsi, lorsque la glycoprotéine est connue, il est possible de soustraire la masse théorique du peptide portant le site, prédite dans les banques de données protéiques, des masses observées sur le spectre de masse, et d'en déduire la composition en monosaccharide de chaque glycoforme. Cependant, cette approche doit être réalisée par MALDI-MS, puisqu'elle présente les avantages de générer des ions moléculaires monochargés, simplifiant l'interprétation des spectres de masse, et d'un meilleur profilage des glycoformes, avec une meilleure sensibilité.

La caractérisation structurale des glycannes ainsi que le séquençage des peptides peuvent être réalisés par des expériences MS/MS, communément opérées par nano-ESI-Q/TOF-MS/MS. La figure 22 illustre les clivages possibles des liaisons peptidiques et glycosidiques se produisant au cours d'expériences de MS en tandem ; la nomenclature des ions fragments peptidiques a été proposée par Roepstorff & Fohlman (1984), puis modifiée par Johnson et al. (1987), tandis que celle des ions fragments glycanniques a été proposée par Domon & Costello (1988). L'occurrence de ces fragments dépend de plusieurs facteurs, tels que l'état de charge, l'énergie de collision (CID), la quantité d'énergie interne et le type d'activation induisant la décomposition des ions précurseurs, et d'autres caractéristiques instrumentales liées au type d'analyseur utilisé. Les ions fragments A, B et C correspondent aux ions pour lesquels la charge est portée par le fragment possédant l'extrémité C-terminal du peptide ou par le fragment possédant l'extrémité non réductrice (distale) de l'oligosaccharide ; tandis que les ions fragments X, Y et Z correspondent aux ions pour lesquels la charge est portée par le fragment possédant l'extrémité N-terminale du peptide ou par le fragment possédant l'extrémité réductrice (proximale) de l'oligosaccharide. De plus, quel que soit l'instrument utilisé, l'occurrence des ions B et Y est la plus importante. Par ailleurs, l'inconvénient de l'analyse CID-MS/MS de glycopeptides, d'une manière générale, est une fragmentation principalement ciblée sur la partie glycannique. Des informations concernant la séquence primaire en monosaccharides, comme la position des points de branchement, des glycannes des glycopeptides peuvent ainsi être obtenues, mais très peu concernant la séquence du peptide, en raison du faible nombre d'ions fragments peptidiques générés, qui ne permettent pas la reconstitution complète de leur séquence en acides aminés.



Figure 22 : Nomenclature des ions fragments générés par l'analyse MS/MS des glycannes (A) et des peptides (B)

Cet inconvénient peut être circonscrit soit en modulant les conditions d'analyses (par ex. énergie de collision), soit en utilisant des spectromètres équipés d'un analyseur IT, capable de reconduire des cycles de sélection/fragmentation supplémentaires des ions moléculaires correspondant au peptide, jusqu'à l'obtention d'un nombre suffisant d'ions fragments, pour la reconstitution complète de sa séquence en acides aminés (Demelbauer *et al.*, 2004). De plus, de récentes approches spectrométriques, telles que l'ETD-MS/MS et l'ECD-MS/MS, respectivement basées sur l'utilisation d'instruments équipés d'analyseurs IT et FTICR, ont

été élaborées et conduisent à une fragmentation préférentielle de l'axe peptidique des glycopeptides, sans affecter la structure de la partie glycannique, permettant ainsi l'identification des sites de N- et de O-glycosylation sur les glycopeptides (Hakansson *et al.*, 2001 ; Mormann *et al.*, 2005 ; Hogan *et al.*, 2005).

### 3- L'analyse glycomique des chaînes glycanniques libérées

## 3.1- Libération des glycannes

Bien que l'analyse structurale des glycannes des glycoprotéines puisse être réalisée par l'analyse glycomique des glycoprotéines ou encore des glycopeptides, elle est généralement réalisée après la libération de ces derniers, et permet d'avoir accès à un plus grand nombre de paramètres structuraux. Au cours de cet exposé, nous ne détaillerons que les techniques de glycomique appliquées à l'étude structurale des N-glycannes et des O-glycannes de type mucine (Fig. 23). D'une manière générale, les N-glycannes sont sélectivement libérés par l'action d'endo-N-acétyl-\beta-glucosaminidases (endo) ou de peptidyl-N-glycosidases (PNGases), comme la PNGase F, qui est la plus communément utilisée en analyse glycomique des glycoprotéines animales (Tarentino & Plummer, 1994). Par ailleurs, compte tenu de sa nature enzymatique, la déglycosylation par la PNGase F nécessite que les glycoprotéines soient sous forme déstructurée, par exemple en présence d'agents réducteurs des ponts disulfures et de détergents ioniques, soit sous forme de glycopeptides protéasiques, afin de maximiser son activité catalytique (Fig. 23). De plus, comme nous l'avions mentionné plus haut, les N-glycannes peuvent être libérés de glycoformes glycoprotéiniques dénaturées et séparées par SDS-/2D-PAGE, dans le gel d'acrylamide (Küster et al., 1997, 2001). Les Oglycannes, quant à eux, sont généralement libérés par  $\beta$ -élimination réductive en présence de soude (Carlson, 1968). La présence d'un agent réducteur prévient la dégradation chimique de l'oligosaccharide libéré, appelée « peeling », en réduisant sa fonction réductrice. Ce procédé de O-déglycosylation chimique a récemment été appliqué à la libération dans le gel d'acrylamide de O-glycannes de glycoformes glycoprotéiniques séparées par PAGE (Taylor et al., 2006). La perte de la fonction réductrice des O-glycannes, nécessaire à leur couplage à des chromophores ou fluorophores, et la destruction irréversible des protéines, constituent les inconvénients majeurs de cette méthode. Malgré ces inconvénients, cette méthode reste, à l'heure actuelle, la plus communément utilisée pour le profilage O-glycomique des Oglycosylprotéines. Néanmoins, la O-déglycosylation chimique dans une solution d'ammoniaque saturée en carbonate d'ammonium, constitue une excellente alternative pour la libération des O-glycannes sous forme réductrice et préserve la structure protéique (Huang *et al.*, 2002). Par ailleurs, la libération enzymatique des O-glycannes de type mucine est limitée par la très grande spécificité catalytique des quelques rares O-glycosidases disponibles sur le marché, et ne permet donc pas l'établissement du O-glycome complet des O-glycosylprotéines de type mucine.



Figure 23 : Stratégie générale employée pour le profilage et la caractérisation structurale du N- et du O-glycome des glycoprotéines

## 3.2- Profilages chromatographiques et électrophorétiques des N- et O-glycomes

Le profilage et le fractionnement des N- et O-glycomes peuvent être réalisés par diverses approches chromatographiques liquides et électrophorétiques (Fig. 23) (Geyer & Geyer, 2006). En effet, les glycannes peuvent être séparés par HPLC d'échange d'anions (Guile *et al.*, 1994), par NP-HPLC (Royle *et al.*, 2002), par RP-HPLC, par HPLC d'échange d'anions à haut pH couplée à une détection par ampérométrie pulsée (HPAEC-PAD) (Cataldi *et al.*, 2000) et par HPLC sur colonnes de carbone graphite poreux (PGC) (Mechref & Novotny, 2002). Compte tenu de leur grande hétérogénéité, les glycannes libérés des glycoprotéines peuvent être fractionnés en utilisant plusieurs dimensions chromatographiques. Par exemple, la NP-HPLC constitue généralement la première dimension chromatographique, utilisée pour le fractionnement des glycannes et peut être complémentée par une seconde dimension chromatographique par RP-HPLC, pour séparer d'éventuels isomères co-élués. Dans le cas

d'un mélange complexe en glycannes neutres et sialylés, un préfractionnement en HPLC d'échange d'anions peut être envisagé avant un fractionnement NP-HPLC. De plus, des éléments structuraux peuvent être obtenus à partir des profils HPLC, puisque le temps de rétention d'un oligosaccharide est influencé par le poids moléculaire, la séquence, le branchement, la position des liaisons interglycosidiques et la configuration des carbones anomériques. Enfin, les structures purifiées par ces différentes approches chromatographiques peuvent être caractérisées par diverses méthodes chimiques, enzymatiques et spectrométriques, que nous détaillerons plus loin.

Le profilage chromatographique ou électrophorétique des glycannes réducteurs requiert généralement leur couplage, par amination réductive, à des amines aromatiques ou aliphatiques fluorescentes (Lamari et al., 2003). Ce couplage a pour effet de considérablement augmenter la sensibilité de détection (fmoles-amoles) et la quantification des oligosaccharides réducteurs en MS et en détection de fluorecence, d'une part, et de permettre leur séparation électrophorétique, d'autre part. La 2-aminopyridine (2-AP) (Hase, 1994) et la 2aminobenzamide (2-AB) (Bigge et al., 1996) sont les agents de couplage les plus utilisés dans les séparations chromatographiques, tandis que l'acide 1-aminopyrène-3,6,8-trisulfonique (APTS) (Guttman & Chen, 1996) et l'acide 8-aminonaphtalène-1,3,6-trisulfonique (ANTS) (Chiesa & O'Neill, 1994) sont les agents de dérivation les plus communément utilisés dans les profilages électrophorétiques des glycannes réducteurs par « fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis » (FACE) (Oefner & Chiesa, 1994; Starr et al., 1996). Enfin, ces techniques séparatives peuvent être couplées à une détection par MS, pour des profilages glycomiques plus précis, plus sensibles et plus résolutifs, sur des chaînes de LC-MS et de CE-MS qui constituent d'excellentes approches analytiques des plateformes de glycomique à haut débit.

Quelle que soit la méthode de profilage utilisée, la caractérisation des glycannes peut être réalisée par leur dégradation exoglycosidasique ou chimique séquentielle suivie de l'analyse des produits de digestion par HPLC (-MS) ou par CE (-MS).

### 3.3- Profilage et caractérisation des N- et O-glycomes des glycoprotéines par MS

### 3.3.1- Profilage des N- et O-glycomes des glycoprotéines par MS

Contrairement aux méthodes séparatives de profilage glycomique, les techniques spectrométriques sont à la fois capables de profiler les N-/O-glycomes totaux d'une glycoprotéine d'intérêt ou d'un mélange de glycoprotéines, présent dans un fluide biologique d'intérêt, avec une sensibilité et une résolution importantes, et de fournir un certain nombre d'informations structurales. En effet, chaque glycanne, difficilement ionisable, est détecté sous la forme d'un ion pseudomoléculaire  $[M+nNa]^{n+}$ , en mode positif, n étant soit égal à 1, en ionisation MALDI, soit supérieur à 1, en ionisation ESI. Grâce à la précision importante en masse des instruments MALDI et ESI, la masse moléculaire et la composition en monosaccharides, en termes de NeuAc, d'HexNAc, d'Hex et de dHex, peuvent directement être attribuées à chaque glycanne. De plus, le couplage des oligosaccharides à une amine aromatique ou aliphatique, par amination réductive, a pour effet d'accroître considérablement la sensibilité de détection de ces molécules par MS, par l'apport d'un site de protonation préférentiel, qui facilite l'ionisation des oligosaccharides, en mode positif. Comme les peptides, les oligosaccharides dérivés sont majoritairement détectés sous forme d'espèces moléculaires [M+nH]<sup>n+</sup>, pouvant être accompagnées de signaux plus faibles [M+nNa]<sup>n+</sup> ou  $[M+nH+mNa]^{(n+m)+}$ , en mode positif.

Le MALDI-TOF est le spectromètre de masse le plus répandu dans les laboratoires bioanalytiques et constitue, avec le nano-ESI-Q/TOF, le principal outil glycobioanalytique que nous avons utilisé au cours de cette thèse. Cet instrument présente de nombreux avantages comme son potentiel à ne générer que des ions moléculaires monochargés, sa grande sensibilité de détection, sa gamme de masse importante, son importante résolution, sa tolérance importante aux sels et à certains contaminants, et la possibilité de l'automatiser, qui font de lui un outil glycobioanalytique incontournable des plateformes de glycomique et de glycoprotéomique à haut débit. De plus, des études ont démontré le potentiel du MALDI-TOF à mener une quantification très précise de chaque analyte glycannique, compte tenu de la linéarité qui existe entre l'intensité du signal de l'espèce pseudomoléculaire [M+Na]<sup>+</sup> d'un N-glycanne neutre et la quantité de matériel déposé sur la cible (Harvey, 2005). L'acide dihydroxybenzoïque (DHB) est la matrice la plus communément utilisée dans l'analyse par MALDI-TOF-MS des glycannes. Les glycannes neutres produisent d'intenses signaux [M+Na]<sup>+</sup>, accompagnés par des signaux plus faibles [M+K]<sup>+</sup>, en mode positif. Par ailleurs,

l'analyse des structures sialylées par MALDI-TOF-MS, en mode réflectron et à extraction retardée, présente un certain nombre d'inconvénients. Les glycannes sialylés sont détectés sous forme d'un mélange, parfois complexe, d'espèces pseudomoléculaires [M+Na]<sup>+</sup>, [M+K]<sup>+</sup> et  $[M-nH+(n+1)Na]^+$ ,  $[M-nH+(n+1)K]^+$  en mode positif, responsables d'une perte de sensibilité. De plus, leur analyse conduit à d'importantes fragmentations en source (durant l'ionisation) et post-source (durant le vol), par perte des résidus de NeuAc, ce qui se traduit par l'apparition d'un grand nombre de signaux d'ions métastables, qui compliquent les profils glycomiques de masse. Ces fragmentations peuvent être limitées en opérant les analyses en mode linéaire négatif, avec, cependant, une moins bonne résolution, et/ou en présence d'une matrice douce, telle que la 2,4,6-trihydroxyacétophénone (THAP) (Papac et al., 1996). De fait, un certain nombre de méthodes chimiques dédiées à augmenter la stabilité des résidus de NeuAc, lors d'analyses MALDI-TOF-MS en mode réflectron, ont été élaborées. La méthylestérification des fonctions carboxyles des résidus de NeuAc, par réaction de leur sel de sodium avec l'iodure de méthyle, permet l'analyse simultanée des structures sialylées et neutres en mode positif (Powell & Harvey, 1996). La méthode de perméthylation développée par Ciucanu & Kerek (1984), modifiée par Ciucanu & Costello (2003), permet également de stabiliser les résidus de NeuAc. La stabilisation des résidus de NeuAc, par ces procédés, a pour effet de rendre l'efficacité d'ionisation des oligosaccharides sialylés équivalente à celle des oligosaccharides neutres, et d'autoriser leur analyse simultanée en mode positif. Ainsi, sous forme perméthylée, les glycannes sialylés et neutres peuvent être quantifiés par MALDI-TOF-MS. Enfin, l'efficacité d'ionisation des oligosaccharides perméthylés en MS est bien plus importante que celle des oligosaccharides natifs, ce qui a pour effet de considérablement augmenter la sensibilité de détection de ces composés. Pour toutes ces raisons, les profilages glycomiques de masse, réalisés au cours de nos travaux de thèse, ont systématiquement été réalisés sur des glycannes perméthylés.

#### 3.3.2- Caractérisation de la structure primaire des glycannes par MS

#### 3.3.2.1- Séquençage et localisation des points de branchement des glycannes par MS

Comme nous l'avons mentionné plus haut, le séquençage et la localisation des points de branchement des glycannes peuvent être déterminés par une simple analyse CID-MS/MS, comme par exemple en nano-ESI-Q/TOF-MS/MS, qui constitue une approche CID-MS/MS également très répandue dans les plateformes de protéomique et de glycomique, et qui permet l'obtention de spectres d'ions fragments de très bonne qualité (Sagi *et al.*, 2002). De plus, elle

constitue l'approche que nous avons utilisée pour toutes nos expériences de séquençage. La fragmentation CID-MS/MS des glycannes se traduit par la présence d'ions fragments majoritairement de type B et de type Y, issus de la rupture des liaisons glycosidiques. En fonction de l'énergie de collision utilisée et de l'état de charge de l'analyte glycannique, la nature et l'intensité du signal des ions fragments seront différentes. Ainsi, la différence de masse entre deux ions fragments de la même série, correspondant à l'incrément de masse d'un résidu monosaccharidique, en termes d'HexNAc, d'Hex et dHex, permet de renseigner sur la séquence primaire en monosaccharides. L'absence de certains fragments d'une série peut signifier la présence d'une ramification et permettre le positionnement d'un point de branchement, au sein de la séquence. De nombreux ions fragments diagnostiques, comme les ions oxonium (ions B), peuvent également être obtenus et permettent de déterminer la composition de certaines antennes. Le séquençage des glycannes peut être réalisé par leur analyse soit sous leur forme native, soit sous leur forme dérivée (amination réductive/perméthylation) (Zaia, 2004 ; Harvey, 2005 ; Morelle et al., 2006). La figure 24 illustre le séquençage nano-ESI-Q/TOF-MS/MS d'un N-glycanne biantenné et fucosylé couplé à une amine aromatique, la benzylamine (Morelle & Michalski, 2004). Les avantages de ce couplage sont de considérablement augmenter la sensibilité de détection et de favoriser la formation d'ions fragments Y, par la présence d'une charge au niveau de l'extrémité réductrice (Harvey, 2005 ; Lattová et al., 2005). De plus, de précieux fragments diagnostiques permettent notamment de localiser la fucosylation au niveau du résidu de GlcNAc proximal.



Figure 24 : Spectre nano-ESI-Q/TOF-MS/MS de l'ion précurseur dichargé [M+Na+H]<sup>2+</sup> à m/z 889 correspondant au N-glycanne dérivé de composition dHex<sub>1</sub>Hex<sub>3</sub>HexNAc<sub>5</sub>-Benzylamine, isolé de la LAMAN bovine.

Par ailleurs, en mode ESI, les glycannes perméthylés forment d'intenses signaux correspondant aux espèces moléculaires  $[M+H]^+$  et  $[M+Na]^+$ , en mode positif. L'analyse nano-ESI-Q/TOF-MS/MS fournit des spectres de fragmentation prédictibles et de très bonne qualité.

De plus, la séquence primaire, de même que la configuration des carbones anomériques des résidus saccharidiques constituant les glycannes, peut être confirmée par leur dégradation chimique et/ou exoglycosidasique séquentielle en solution, suivie de l'analyse par MALDI-TOF-MS des produits de digestions purifiés (Jacob & Scudder, 1994 ; Rudd *et al.*, 1997). Les digestions peuvent, peuvent par ailleurs, être directement réalisées sur cible MALDI en utilisant des quantités picomolaires d'analytes glycanniques, suivies de l'analyse directe des produits de digestion cocristallisés avec une matrice par MALDI-TOF-MS (Jacob & Scudder, 1994 ; Mechref & Novotny, 1998 ; Geyer *et al.*, 1999).

### 3.3.2.2- Positionnement des liaisons interglycosidiques par MS

En fonction des outils glycobioanalytiques spectrométriques et de la quantité de matériel disponibles, il y a deux types d'approches pour le positionnement des liaisons interglycosidiques. La première consiste en l'analyse de l'oligosaccharide d'intérêt, natif ou dérivé, par CID-MS/MS à haute énergie, par exemple sur des instruments équipés d'un analyseur TOF/TOF (Mechref et al., 2003; Morelle et al., 2004, 2005), permettant la formation d'ions fragments intracycliques A et X (Fig. 22). Tandis que les ions fragments des séries B/Y et Z/C, renseignent sur l'enchaînement des monosaccharides, au sein de la séquence, les ions fragments intracycliques des séries A/X renseignent sur la position des liaisons interglycosidiques. Par ailleurs, la fragmentation CID à faible énergie d'espèces moléculaires d'oligosaccharides natifs et perméthylés, réalisée sur un spectromètre nano-ESI-Q/TOF par exemple, peut conduire à la formation de quelques rares ions fragments intracycliques, généralement de type A, très faiblement détectés sur les spectres. De plus, la fragmentation par collision à faible énergie d'un ion moléculaire précurseur  $[M+nH]^{n+}$ , d'un glycanne perméthylé, conduit à l'élimination du substituant lié en position 3 d'un résidu de HexNAc pour former un ion fragment secondaire de type E, un diène stabilisé par conjugaison qui permet la différenciation des antennes de type 1 et de type 2 (Viseux et al., 1997, 1998).

La seconde approche, qui requiert une quantité de matériel plus importante, consiste en l'analyse GC-EI-MS des alditols partiellement méthylés et acétylés (PMAA) (Hellerqvist, 1990, Geyer & Geyer, 1994). Les glycannes perméthylés sont hydrolysés en milieu acide, pour former des glycosides partiellement méthylés, caractérisés par la présence de fonctions hydroxyles libres, qui étaient engagées dans une liaison glycosidique. Après marquage de leur carbone en position 1 par deutéroréduction, les fonctions hydroxyles libres des glycosides alditols sont marquées par acétylation. Les PMAA sont enfin analysés en GC-EI-MS. L'identification des différents types de résidus est réalisée sur la base de leur temps de rétention et des spectres EI-MS d'ions fragments. Les valeurs des rapports m/z des ions fragments permettent d'identifier le nombre et la position des groupes acétoxyles, qui marquent la position des liaisons interglycosidiques. Cette approche analytique est également applicable à l'étude structurale des produits de dégradations chimiques et exoglycosidasiques séquentielles en solution des glycannes, et permet de confirmer leur séquence primaire, d'une part, et, d'autre part, d'attribuer pour chaque résidu monosaccharidique la position des

liaisons glycosidiques qu'il contracte au sein de la séquence, de l'extrémité non réductrice à l'extrémité non réductrice. Contrairement à la première approche, plus sensible et plus rapide, cette technique est incompatible avec les approches de glycomique à haut débit.

# CHAPITRE I :

# RELATION STRUCTURE-FONCTION DE LA GLYCOSYLATION DE L'α-MANNOSIDASE HUMAINE (rhLAMAN) : DETERMINATION DE L'HETEROGENEITE GLYCANNIQUE PAR SITE DE LA LAMAN BOVINE (bLAMAN)

1-INTRODUCTION ET OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE	101
1.1-Introduction	101
1.2-Objectifs du travail de thèse	103
2-RESULTATS	104
3-DISCUSSION	105

#### **1- INTRODUCTION ET OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE**

#### **1.1- Introduction**

L' $\alpha$ -mannosidase lysosomale (LAMAN ; EC 3.2.1.24) appartient à la famille des  $\alpha$ -mannosidases de classe II (Moremen, 1994 ; Daniel *et al.*, 1994). La LAMAN est l'une des exoglycosidases impliquées dans le catabolisme lysosomal des N-glycosylprotéines, capable de dégrader toutes les liaisons  $\alpha$ -mannosidiques connues (Aronson & Kuranda, 1989). Contrairement aux autres membres de la famille des glycoside-hydrolases 38 (GH 38) (Henrissat & Bairoch, 1993), la LAMAN est caractérisée par une activité à bas pH, compte tenu de sa fonction et de sa localisation intracellulaires (Heikinheimo *et al.*, 2003).

De nombreuses études, réalisées sur la LAMAN humaine (hLAMAN) ont montré que l'enzyme est synthétisé sous la forme d'un précurseur polypeptidique monocaténaire, d'environ 110 kDa, qui, au cours de son trafic intracellulaire, subit une maturation protéolytique orchestrée par les cathepsines de l'endosome tardif et du lysosome, conduisant à la formation de deux à dix chaînes peptidiques, en fonction des espèces (Pohlmann et al., 1983; Cheng et al., 1986; Tsuji & Suzuki, 1987; Nilssen et al., 1997). Bien que la plupart des sites de protéolyse soient très conservés d'espèces en espèces, cette maturation protéolytique ne semble pas indispensable à l'activité biologique de la LAMAN. Des études biochimiques, réalisées sur la hLAMAN recombinante (rhLAMAN), exprimée dans des cellules CHO, ont en effet montré que, même sous forme monocaténaire, elle est capable d'exercer son activité catalytique, en conservant les mêmes paramètres enzymologiques (Berg et al., 2001). De plus, quelle que soit l'espèce, la LAMAN est caractérisée par la présence d'un motif structural, rigoureusement conservé dans l'évolution, formé d'une boucle octapeptidique, stabilisée par un pont disulfure intrachaîne (Cys<sup>493</sup>-Cys<sup>501</sup>), N-glycosylée au niveau de la séquence «<sup>497</sup>Asn-Iso/Val-Ser/Thr<sup>499</sup>» par un N-glycanne très particulier de type oligomannosidique monoglucosylé (Glc<sub>1</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>). Ce glycanne est très particulier, puisque, comme nous l'avions mentionné, il constitue un signal de rétention réticulaire, reconnu par les lectines chaperonnes calnexine/calréticuline, et, de fait, est généralement absent des glycoprotéines matures secrétées. Ce motif structural confère à la LAMAN une importante stabilité au niveau du lysosome. En effet, le pont disulfure Cys<sup>493</sup>-Cys<sup>501</sup> intervient dans l'orientation correcte du N-glycanne vers un domaine peptidique formé de trois hélices  $\alpha$ , joignant les chaînes peptidiques b et c. L'interaction de cette structure oligosaccharidique particulière avec ces surfaces diminue la flexibilité de la protéine, cette rigidité structurale lui conférant une résistance accrue vis-à-vis des activités protéasiques endosomales et lysosomales (Heikinheimo *et al.*, 2003).

L'α-mannosidose (OMIM 248500) est une thésaurismose rare (prévalence : 1/1000000), est causée par l'une des cinquante mutations affectant le gène MANB (Berg et al., 1999), codant pour la LAMAN. Elle conduit à une accumulation massive de N-glycannes partiellement dégradés au sein du lysosome (Michalski, 1996; Thomas, 2001). La surcharge lysosomale en N-glycannes de type oligomannosidique dans les tissus périphériques évolue à leur excrétion urinaire (Norden et al., 1973; Strecker et al., 1976; van Halbeek et al., 1980; Yamashita et al., 1980 ; Matsuura et al., 1981 ; Egge et al., 1982). L'α-mannosidose a également été décrite chez le bovin (Berg et al., 1997; Tollersrud et al., 1997), le chat (Berg et al., 1997) et le porc (Berg et al., 2001). Les patients souffrant de cette grave maladie métabolique sont caractérisés par des phénotypes cliniques très variés, incluant les retards psychomoteurs, la perte d'audition, l'hépatosplénomégalie, les dysostoses multiples et les dysmorphies faciales. Hormis ces phénotypes cliniques, communs aux glycoprotéinoses, les patients souffrant d'amannosidose se caractérisent également par des syndromes d'immunodéficiences, dues aux interactions des oligomannosides, présents en grande quantité dans le sérum, avec un certain nombre de molécules impliquées dans la réponse immunitaire, dont l'IL-2 (Zanetta et al., 1996 ; Malm et al., 2000).

A l'heure actuelle, les deux options thérapeutiques majeures de l' $\alpha$ -mannosidose, encore au stade expérimental, sont la thérapie enzymatique substitutive (Desnick & Schuchman, 2002 ; Gabrowski & Hopkin, 2003) et la greffe de moelle osseuse (Walkley & Dobrenis, 1995 ; Vellodi, 2006). La thérapie enzymatique substitutive a fait ses preuves, depuis plus de quinze ans, dans le traitement expérimental de la maladie de Gaucher type 1, une autre thésaurismose causée par un déficit génétique en glucocérébrosidase (Barton *et al.*, 1991). La stratégie utilise la propriété, qu'ont la plupart des cellules, de capturer et d'adresser vers le lysosome les hydrolases extracellulaires, porteuses du signal Man-6-P, par le biais des MPR de la membrane plasmique (Dhami & Schuchman, 2003). De nombreuses recherches, exploitant cette propriété biologique, ont été menées sur des modèles animaux atteints d'un grand nombre de pathologies de surcharge lysosomale (Futerman & van Meer, 2004). D'une manière générale, ces travaux ont montré une réduction significative de la quantité de matériel accumulé dans la plupart des tissus périphériques, et une augmentation de la survie et de la qualité de vie des sujets. Berg et *al.* (2001) ont pu démontrer l'efficacité de la thérapie

enzymatique substitutive par la LAMAN humaine recombinante (rhLAMAN) sur des cellules fibroblastiques en culture, déficientes en LAMAN. Ils ont pu montrer, en effet, que l'enzyme est correctement adressé vers le lysosome et qu'il réduisait significativement le taux de matériel glucidique accumulé. Cette performance a pu être reproduite par l'administration intraveineuse de rhLAMAN à des souris KO pour le gène codant pour la LAMAN (Roces *et al.*, 2004) et à des animaux modèles, comme le porc (Crawley *et al.*, 2006).

## 1.2- Objectifs du travail de thèse

Notre travail de thèse s'inscrit dans le cadre du programme de recherche européen « EURAMAN », dont les objectifs consistent en l'élucidation des mécanismes moléculaires associés à la pathogénèse de l'a-mannosidose et en la conception de stratégies thérapeutiques. Dans le cadre de ce projet, les travaux, initiés dans notre laboratoire, sont consacrés à : (1) l'étude de la relation structure-fonction de la glycosylation de la LAMAN, et (2) l'évaluation de l'efficacité thérapeutique de la rhLAMAN, dans le traitement futur de l'α-mannosidose. Comme nous l'avions vu dans l'exposé bibliographique, les glycannes peuvent influencer les propriétés physicochimiques, biologiques et immunologiques, et la clairance plasmatique des glycoprotéines. Les glycannes peuvent donc, également, affecter les propriétés pharmacologiques des glycoprotéines recombinantes thérapeutiques. Ainsi, l'étude structurale des chaînes glycanniques de ces glycoprotéines, destinées à un usage thérapeutique, est primordiale à l'évaluation de leur efficacité, notamment dans le traitement d'un certain nombre de maladies inflammatoires chroniques et de pathologies métaboliques congénitales. Dans le cadre du traitement expérimental de l'a-mannosidose, cette étude doit tout particulièrement permettre de contrôler la présence de N-glycannes Man-6-phosphorylés sur la rhLAMAN, qui permettront son adressage vers le lysosome des cellules déficientes, ainsi que le taux éventuels de N-glycannes de type oligomannosidique et asialoglycannes lactosaminiques, qui influenceraient les propriétés pharmacocinétiques de l'enzyme. Afin d'évaluer l'efficacité thérapeutique de la rhLAMAN, notre travail de thèse a donc consisté à mettre au point des méthodologies de glycomique appliquées à l'étude de la glycosylation par site de la bLAMAN, qui constitue notre modèle moléculaire de l'étude de la hLAMAN et de la pathogénèse moléculaire de l'α-mannosidose.

La bLAMAN est une glycoprotéine homodimérique de 250 kDa, dont le monomère est synthétisé sous la forme d'une chaîne polypeptidique de 949 acides aminés (Tollersrud *et al.*, 1997). Dès sa sortie de la voie de sécrétion, au niveau de l'endosome tardif et du lysosome, ce

précurseur est maturé par protéolyse en cinq chaînes glycopeptidiques (a, b, c, d et e) dont les masses moléculaires respectives sont 35/38, 11/13, 22, 38 et 13/15 kDa. Les chaînes peptidiques a, b et c sont liées par deux ponts disulfures, les chaînes peptidiques d et e étant annexées au reste de la molécule par un réseau de ponts salins (Fig. 25).



Figure 25 : Représentation schématique de la structure de la bLAMAN

La bLAMAN possède huit sites potentiels de N-glycosylation, occupés par des glycannes (Tollersrud *et al.*, 1997). L'étude de la N-glycosylation par site a été réalisée sur la base de la sensibilité, de chacune des cinq chaînes glycopeptidiques, à l'endo-N-acétyl-β-glucosaminidase H (endo H) et/ou PNGase F, séparées par SDS-PAGE et immunodétectées en western-blot. Cependant, aucune donnée, concernant la structure détaillée des glycannes et leur positionnement sur les huit sites de glycosylation de la bLAMAN, n'a été rapportée.

## **2- RESULTATS**

Ces travaux font l'objet d'un article publié dans *Glycobiology* :

Faid V, Evjen G, Tollersrud OK, Michalski JC, Morelle W. Site-specific glycosylation analysis of the bovine lysosomal alpha-mannosidase. Glycobiology. 2006; 16(5):440-61.

## Site-specific glycosylation analysis of the bovine lysosomal α-mannosidase

# Valegh Faid<sup>2</sup>, Gry Evjen<sup>3</sup>, Ole-Kristian Tollersrud<sup>3</sup>, Jean-Claude Michalski<sup>2</sup>, and Willy Morelle<sup>1,2</sup>

<sup>2</sup>Unité Mixte de Recherche CNRS/USTL 8576, «Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle», IFR 118, Bâtiment C9, Université des Sciences et Technologies de Lille 1, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France; and <sup>3</sup>Department of Medical Biochemistry, Institute of Medical Biology, University of Tromsø, 9037 Tromsø, Norway

Received on December 7, 2005; revised on January 23, 2006; accepted on January 23, 2006

Lysosomal  $\alpha$ -mannosidase is a broad specificity exoglycosidase involved in the ordered degradation of glycoproteins. The bovine enzyme is used as an important model for understanding the inborn lysosomal storage disorder  $\alpha$ -mannosidosis. This enzyme of about 1000 amino acids consists of five peptide chains, namely a- to e-peptides and contains eight N-glycosylation sites. The  $N^{497}$  glycosylation site of the c-peptide chain is evolutionary conserved among LAMANs and is very important for the maintenance of the lysosomal stability of the enzyme. In this work, relying on an approach based on mass spectrometric techniques in combination with exoglycosidase digestions and chemical derivatizations, we will report the detailed structures of the N-glycans and their distribution within six of the eight *N*-glycosylation sites of the bovine glycoprotein. The analysis of the PNGase F-released glycans from the bovine LAMAN revealed that the major structures fall into three classes, namely high-mannose-type (Fuc<sub>0-1</sub>Glc<sub>0-1</sub>Man<sub>4-9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>), hybrid-type (Gal<sub>0-1</sub>Man<sub>4-5</sub>GlcNAc<sub>4</sub>), and complex-type (Fuc<sub>0-1</sub>Gal<sub>0-2</sub>Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>3-5</sub>) *N*-glycans, with core fucosylation and bisecting GlcNAc. To investigate the exact structure of the N-glycans at each glycosylation site, the peptide chains of the bovine LAMAN were separated using SDS-PAGE and in-gel deglycosylation. These experiments revealed that the  $N^{497}$  and  $N^{930}$  sites, from the c- and e-peptides, contain only high-mannose-type glycans Glc<sub>0-1</sub>Man<sub>5-9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>, including the evolutionary conserved Glc1Man9GlcNAc2 glycan, and Fuc<sub>0-1</sub>Man<sub>3-5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>, respectively. Therefore, to determine the microheterogeneity within the remaining glycosylation sites, the glycoprotein was reduced, carboxymethylated, and digested with trypsin. The tryptic fragments were then subjected to concanavalin A (Con A) affinity chromatography, and the material bound by Con A-Sepharose was purified using reversephase high-performance liquid chromatography (HPLC). The tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) and the MALDI analysis of the PNGase F-digested glycopeptides indicated that (1)  $N^{692}$  and  $N^{766}$  sites from the d-peptide chain both bear glycans consisting of high-mannose (Fuc<sub>0-1</sub>Man<sub>3-7</sub>GlcNAc<sub>2</sub>), hybrid ( $Fuc_{0-1}$  Gal<sub>0-1</sub>Man<sub>4-5</sub>GlcNAc<sub>4</sub>), and complex ( $Fuc_{0-1}Gal_{0-2}Man_3GlcNAc_{4-5}$ ) structures; and (2) the  $N^{367}$  site, from the b-peptide chain, is glycosylated only with highmannose structures (Fuc<sub>0-1</sub>Man<sub>3-5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>). Taking into consideration the data obtained from the analysis of either the in-gel-released glycans from the abc- and c-peptides or the tryptic glycopeptide containing the  $N^{367}$  site, the  $N^{133}$ site, from the a-peptide, was shown to be glycosylated with truncated and high-mannose-type (Fuc<sub>0-1</sub>Man<sub>4-5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>), complex-type (Fuc<sub>0-1</sub>Gal<sub>0-1</sub>Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>5</sub>), and hybrid-type (Fuc<sub>0-1</sub>Gal<sub>0-1</sub>Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>4</sub>) glycans.

*Key words:* α-mannosidosis/glycosylation sites/lysosomal storage disorder/mass spectrometry/structure analysis

#### Introduction

Lysosomal α-mannosidase (LAMAN; EC 3.2.1.24) belonging to class II  $\alpha$ -mannosidases is an exoglycosidase that cleaves all  $\alpha$ -mannosyl linkages known during the degradation of N-linked oligosaccharides (Aronson and Kuranda, 1989). LAMAN is expressed in all tissues and in many species. This enzyme is characterized by broad natural substrate specificity, its sensitivity to the swainsonine inhibitor, its capacity to retain the anomeric configuration of the related mannae residues (Howard et al., 1997), and its capability to hydrolyze *p*-nitrophenylmannopyranoside (for review, see Daniel et al., 1994; Moremen et al., 1994). Contrary to the other members of the sequence-based glycoside-hydrolase family 38 (GH 38) (Henrissat and Bairoch, 1993), LAMAN is characterized by low-pH activation (Heikinheimo et al., 2003), depending on the intracellular location on the lysosome and lack of activity at neutral pH.

Numerous metabolic studies, particularly on human LAMAN (Pohlmann et al., 1983; Cheng et al., 1986; Tsuji and Suzuki, 1987; Nilssen et al., 1997), have shown that the enzyme is synthesized as a single-chain precursor close to 110 kDa, which is further proteolytically processed into several peptides (two to 10) during its intracellular traffic from the endoplasmic reticulum (ER) to the lysosome. These evolutionary preserved cleavages play no physiological role, since the enzyme exists as a functionally single-chain polypeptide (Berg et al., 1999). Human LAMAN consists of two immunologically identical isoforms A and B, which are selectively separated by ion-exchange chromatography and differ in their isoelectric point, arising from different states of sialylation and/or phosphorylation of mannose residues (Cheng et al., 1986). The human enzyme is first synthesized as three glycopeptides of 70, 42, and 15 kDa, generated from the proteolysis of 110 kDa chain precursor which is partly secreted into the extracellular medium. The 70-kDa glycopeptide will further undergo a second proteolytic process on its way to the lysosome to produce three more glycopeptides,

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>To whom correspondence should be addressed; e-mail: willy.morelle@univ-lille1.fr

<sup>©</sup> The Author 2006. Published by Oxford University Press. All rights reserved. For permissions, please e-mail: journals.permissions@oxfordjournals.org 440

joined by two disulfide bridges. Moreover, another posttranslational modification appears to be evolutionary conserved involving one *N*-glycosylation consensus site ( $^{497}N$ -I/ V-S/T<sup>499</sup>) and two proximate cysteines (C<sup>493</sup> and C<sup>501</sup>) organized as a loop. This structural modification appears to be essential for the maintenance of lysosomal stability.

Lack of this enzyme causes a lysosomal storage disorder, named  $\alpha$ -mannosidosis (OMIM 248500). This genetic defect is responsible for a massive accumulation of unprocessed mannose-containing oligosaccharides within lysosomes in most cell types of patients, resulting in varying neural, immune, and skeletal abnormalities. Patients are characterized by varying clinic presentations including mental retardation, recurrent infections, hearing loss, hepatosplenomegaly, and dysostosis multiplex as the most known (Thomas and Beaudet, 1995; Michalski, 1996; Michalski and Klein, 1999). α-Mannosidosis is known to occur in human (Nilssen et al., 1997), cattle (Berg, Healy, et al., 1997; Tollersrud et al., 1997), Persian cat (Berg, Tollersrud, et al., 1997), and guinea pig (Berg and Hopwood, 2001), and a gene knockout model in mice has been established. Several groups have cloned the LAMAN gene (MANB), comprising 24 exons, spanning 21.5 kb and located in chromosome 19p13.2-q12 (Liao et al., 1996; Nilssen et al., 1997; Riise *et al.*, 1997). More than 50  $\alpha$ -mannosidosiscausing mutations have been reported (Nilssen et al., 1997; Gotoda et al., 1998; Berg et al., 1999). These disease-causing mutations are responsible for the total or partial inactivation of LAMAN by disturbing its intracellular traffic (Hansen et al., 2004), structure, and activity (Heikinheimo et al., 2003).

The bovine enzyme is an important molecular model for understanding the human enzyme and pathophysiology of  $\alpha$ mannosidosis. Heikinheimo et al. (2003) have recently solved its three-dimensional structure, the first structure of a mammalian enzyme in GH 38 family, providing a basis for understanding the human disease at the atomic level. The active site, formed by the a- and b-peptides, is located to the N-terminal side and is formed on the top of a distorted seven-stranded  $\alpha/\beta$ -barrel. Following the barrel domain, the structure consists of a three-helix bundle, joining the b- and c-peptides, and three subsequent  $\beta$ -sheet domains, formed by c-, d-, and e-peptides, with unknown function. In addition, the lysosomal enzyme has a large evolutionary conserved carbohydrate chain at the  $N^{497}$  glycosylation site, resting ordered against the three-helix bundle. The structure suggests signal areas for mannose phosphorylation and a low-pH activation mechanism. The bovine LAMAN is about 250 kDa homodimeric glycoprotein. The matching monomer is synthesized as a 110 kDa precursor of about 1000 amino acids, which is further post-translationally modified by N-glycosylation, disulfide bridge formation, and proteolysis into five glycopeptides named a, b, c, d, and e of 35/38, 11/13, 22, 38, and 13/15 kDa, respectively (Tollersrud et al., 1997). The a-, b-, and c-peptides are linked by two disulfide bridges, d- and e-peptides being linked via salt bridge networks (Tollersrud et al., 1997; Heikinheimo et al., 2003). Since the carbohydrate moiety plays many key roles in the biology of most cellular glycoproteins, such as resistance against proteolysis, folding, or intracellular trafficking (for reviews see Varki, 1993; Parodi, 2000; Helenius and Aebi, 2001, 2004; Spiro, 2002; Trombetta, 2003), bovine LAMAN glycosylation has been investigated. Indeed, eight putative N-glycosylation

sites  $(N^{133}, N^{367}, N^{497}, N^{645}, N^{651}, N^{692}, N^{766}, \text{and } N^{930})$  were present within the polypeptide backbone. Molecular shift analysis of the bovine enzyme by SDS-PAGE after endoβ-N-acetylglucosaminidase H (endoH) and/or peptidyl-N-glycosidase F (PNGase F) treatments suggested that all potential sites are glycosylated (Tollersrud et al., 1997). Then, depending on their endoH resistance, it was possible to conclude that a-peptide  $(N^{133})$  and most sites of d-peptide  $(N^{645}, N^{651}, N^{692}, \text{ and } N^{766})$  are occupied by complex-type *N*-glycans. b-  $(N^{367})$  and c-  $(N^{497})$  peptides are exclusively occupied by oligomannose-type and/or hybrid-type N-glycans. With respect to e-peptide  $(N^{930})$ , complex-type with oligomannosetype and/or hybrid-type N-glycans are present. N-glycosylation site  $N^{497}$  is conserved in all LAMANs from plants to mammals (Berg T, Hansen GM, et al., in preparation). In addition, an unusual monoglucosylated oligomannose glycan  $(Glc_1Man_9GlcNAc_2)$  carried by *N*-glycosylation site  $N^{497}$ has also been described. This atypical structure is a retention signal for the calnexin/calreticulin quality-control pathway in the ER (for reviews see Rudd and Dwek, 1997; Parodi, 2000; Spiro, 2002; Trombetta, 2003; Helenius and Aebi, 2004; Trombetta and Parodi, 2005). The presence of this monoglucosylated oligomannose-type glycan in a mature and secreted glycoprotein indicates that the oligosaccharide is located in a region which is not folded by the calnexin/calreticulin system and prevents the removal of the terminal glucose residue by ER- $\alpha$ -glucosidase II (Crispin *et al.*, 2004).

So far, no data have been reported about the detailed structure of N-glycans or about the site occupancy of the eight N-glycosylation sites. To understand the functions of N-glycans in the biology of LAMANs, we have elucidated the detailed structures of all N-glycans in the bovine LAMAN on one hand and their distribution within each site of N-glycosylation on the other hand.

#### Results

#### LAMAN isolation

Bovine LAMAN (primary access number Swiss-Prot: Q29451) was isolated from homogenized Bos Taurus kidney, as published previously (Tollersrud *et al.*, 1997).

# Strategy for determining the structure of the major glycans released from the bovine LAMAN

The general strategy employed for investigating glycosylation pattern of the bovine LAMAN is outlined in Scheme 1.

The detailed structures of glycans of the bovine LAMAN have been determined after digestion by trypsin of the reduced carboxamidomethylated glycoprotein. Glycans were then released from the resulting peptide/glycopeptide mixture by digestion with PNGase F. The PNGase Freleased *N*-glycans were separated from peptides using a C18 Sep-Pak cartridge and desalted on nonporous graphitized carbon solid-phase extraction cartridge. Because of the availability of only limited amounts of material, the oligosaccharides were analyzed as mixtures. PNGase F-released *N*-glycans were characterized by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-MS) before and after on-plate sequential exoglycosidase digestions.



Scheme 1. Strategy dedicated to the determination of the structures of the N- and O-linked glycans of the bovine LAMAN.

Their methylated derivatives were also characterized by MALDI-MS before and after sequential exoglycosidase digestions and by linkage analysis. Structural assignments were based on molecular weight, susceptibility to exoglycosidase digestions, and linkage data. Putative *O*-glycans were released by reductive elimination, permethylated, purified on a C18 Sep-Pak cartridge, and analyzed by MALDI-MS.

# Determination of the structure of N-glycans released from bovine LAMAN

#### Monosaccharide composition of PNGase F-released

*glycans.* The monosaccharide composition of the PNGase F-released N-glycans from bovine LAMAN was determined by GC-MS analysis of the heptafluorobutyrate derivatives of the methyl glycosides. The data revealed the presence of Fuc, Gal, Glc, Man, and GlcNAc residues at a molar ratio of approximately 2:1:0,3:6:1, respectively (data not shown). These results suggest that the major N-glycans of bovine LAMAN have compositions consistent with high-mannose-type structures. Moreover, the same experiment has been reproduced on the entire glycoprotein to determine the

carbohydrate content which was of about 10% (w/w), and no GalNAc residues have been detected. This last observation suggests that no O-glycans are present within the polypeptide backbone of the bovine LAMAN.

#### MALDI-MS analysis of the PNGase F-released glycans.

The desalted PNGase F-released N-glycans were analyzed by MALDI-MS. The data from the MALDI-MS analysis are shown in Figure 1A and summarized in Table I. A very heterogeneous mixture of oligosaccharides was observed, affording about 20 pseudomolecular ions  $[M+Na]^+$ . From their m/z ratio, monosaccharide compositions in terms of Hex, dHex, and HexNAc of each PNGase F-released oligosaccharide from bovine LAMAN have been determined and are summarized in Table I. Based on the MALDI-MS data and currently accepted models of eukaryotic N-glycan biosynthesis, these data indicate that bovine LAMAN contains glycans having a composition consistent with high-mannose structures  $(Fuc_{0-1}Hex_{4-10}HexNAc_2; including the evolutionary)$ conserved monoglucosylated oligomannosidic glycan  $Glc_1Man_9GlcNAc_2$ ), hybrid structures (Hex<sub>4-6</sub>HexNAc<sub>4</sub>),



Fig. 1. MALDI-MS spectra of PNGase F-released *N*-glycans from bovine LAMAN (A), after treatment with  $\beta$ -galactosidase (B), after treatment with  $\beta$ -galactosidase and  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidase (C), after treatment with  $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidase and after treatment with  $\alpha$ -mannosidase (D). Bovine LAMAN was reduced, alkylated, and digested with trypsin. Glycans were then released from the resulting peptides/glycopeptides by digestion with PNGase F. PNGase F-released glycans were separated from peptides using a C18 Sep-Pak cartridge and desalted on a nonporous graphitized carbon solid-phase extraction cartridge. The glycans were then analyzed in positive ion reflective mode before and after on-target exoglycosidase digestions, as [M+Na]<sup>+</sup> pseudomolecular ions. a, GlcNAc may be linked to either arm, forming a triantennary structure (1–4 or 1–6 linkage) or the core  $\beta$ -linked mannose to form a bisected structure (1–4 linkage). b, Gal may be attached to any arm.

 Table I. Assignment of pseudomolecular ion [M+Na]<sup>+</sup> observed in

 MALDI-MS spectrum of the PNGase F-released N-glycans from bovine

 LAMAN

$\begin{array}{l} \left[ M+Na \right]^{+} \\ \left( m/z \right) \end{array}$	Assignment	$\begin{bmatrix} M+Na \end{bmatrix}^+ \\ (m/z)$	Assignment
933	Hex <sub>3</sub> HexNAc <sub>2</sub>	1663	Hex <sub>5</sub> HexNAc <sub>4</sub>
1079	dHex <sub>1</sub> Hex <sub>3</sub> HexNAc <sub>2</sub>	1688	dHex1Hex3HexNAc5
1095	Hex <sub>4</sub> HexNAc <sub>2</sub>	1704	Hex <sub>4</sub> HexNAc <sub>5</sub>
1257	Hex <sub>5</sub> HexNAc <sub>2</sub>	1743	Hex <sub>8</sub> HexNAc <sub>2</sub>
1339	Hex <sub>3</sub> HexNAc <sub>4</sub>	1825	Hex <sub>6</sub> HexNAc <sub>4</sub>
1403	dHex <sub>1</sub> Hex <sub>5</sub> HexNAc <sub>2</sub>	1850	dHex1Hex4HexNAc5
1419	Hex <sub>6</sub> HexNAc <sub>2</sub>	1866	Hex <sub>5</sub> HexNAc <sub>5</sub>
1501	Hex <sub>4</sub> HexNAc <sub>4</sub>	1905	Hex <sub>9</sub> HexNAc <sub>2</sub>
1542	Hex <sub>3</sub> HexNAc <sub>5</sub>	2012	dHex1Hex5HexNAc5
1581	Hex <sub>7</sub> HexNAc <sub>2</sub>	2067	Hex <sub>10</sub> HexNAc <sub>2</sub>

and complex structures ( $Fuc_{0-1}Hex_{3-5}HexNAc_{3-5}$ ). Notable features of these data are as follows: (1) oligomannosidic structures are more abundant than complex structures; and (2) most of the complex structures have compositions consistent with bi- and/or triantennary structures. It is important to note that compositions consistent with isobaric complex and hybrid structures were differentiated according to their endoH sensitivity (data not shown). Indeed, endoH releases only high-mannose and hybrid-type *N*-glycans from glycoproteins. The native *N*-glycans were also analyzed in the negative mode. No signals were detected, suggesting that no acidic structures (phosphorylated, sulfated, or sialylated) were present (data not shown).

Sequential exoglycosidase digestion of the PNGase F-released glycan mixture of the bovine LAMAN. To determine the carbohydrate sequence as well as the anomeric configurations, the PNGase F-released glycans were subjected to onplate treatments with an array of exoglycosidases and then analyzed by MALDI-MS (Mechref and Novotny, 1998) (Figure 1B–D). After treatment with  $\beta$ -galactosidase (Figure 1B), the pseudomolecular ions  $[M+Na]^+$  at m/z 1704 (Hex<sub>4</sub>HexNAc<sub>5</sub>), 1825  $(\text{Hex}_{6}\text{Hex}\text{NAc}_{4}),$ 1850 (dHex<sub>1</sub>Hex<sub>4</sub>HexNAc<sub>5</sub>), 1866 (Hex<sub>5</sub>HexNAc<sub>5</sub>), and 2012 (dHex<sub>1</sub>Hex<sub>5</sub>HexNAc<sub>5</sub>) were significantly reduced in intensity, with a significant concomitant increase in the abundance of the molecular ions at m/z 1542 (Hex<sub>3</sub>HexNAc<sub>5</sub>), 1663 (Hex<sub>5</sub>HexNAc<sub>4</sub>), and 1688 (dHex<sub>1</sub>Hex<sub>3</sub>HexNAc<sub>5</sub>), consistent with the removal of one or two terminal  $\beta$ -Gal residues. The combined digestions with  $\beta$ -galactosidase and  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidase (Figure 1C) have greatly simplified the MALDI-MS spectrum, which is now characterized by several major pseudomolecular ions [M+Na]<sup>+</sup> at m/z 933 (Hex<sub>3</sub>HexNAc<sub>2</sub>), 1079 (dHex<sub>1</sub>Hex<sub>3</sub>HexNAc<sub>2</sub>), 1257 (Hex<sub>5</sub>HexNAc<sub>2</sub>), 1419 (Hex<sub>6</sub>HexNAc<sub>2</sub>), 1581  $(\text{Hex}_{7}\text{Hex}\text{NAc}_{2})$ , 1743  $(\text{Hex}_{8}\text{Hex}\text{NAc}_{2})$ , and 1905  $(Hex_0HexNAc_2)$ . All these species were unaffected by the above exoglycosidase digestions, a result that is consistent with the assignment of high-mannose structures to these ions. Minor molecular ions were also observed at m/z 1095 (Hex<sub>4</sub>HexNAc<sub>2</sub>), 1403 (dHex<sub>1</sub>Hex<sub>5</sub>HexNAc<sub>2</sub>),

444

and 2067 (Hex<sub>10</sub>HexNAc<sub>2</sub>). The molecular species at m/z1339 ( $\text{Hex}_3\text{HexNAc}_4$ ), 1501 ( $\text{Hex}_4\text{HexNAc}_4$ ), 1542 (Hex<sub>3</sub>HexNAc<sub>5</sub>), 1663 ( $\text{Hex}_5\text{Hex}\text{NAc}_4$ ), and 1688  $(dHex_1Hex_2HexNAc_5)$  were efficiently digested by  $\beta$ -Nacetylhexosaminidase to the products Fuc<sub>0-1</sub>Hex<sub>3</sub>HexNAc<sub>2</sub> at m/z 1079 and 933, which are consistent with trimannosyl core with and without core fucosylation, respectively. It can then be concluded that the GlcNAc residues of the *N*-glycans antenna are  $\beta$ -linked. The disappearance of pseudomolecular ions at m/z 1501 (Hex<sub>4</sub>HexNAc<sub>4</sub>) and 1663  $(\text{Hex}_5\text{Hex}\text{NAc}_4)$  is accompanied by a concomitant increase of the relative abundance of the pseudomolecular species at m/z 1095 (Hex<sub>4</sub>HexNAc<sub>2</sub>) and 1257 (Hex<sub>5</sub>HexNAc<sub>2</sub>), suggesting that these two initial species were consistent with the composition of hybrid structures. After  $\alpha$ -mannosidase treatment (Figure 1D), the molecular ions at m/z 1079 (dHex<sub>1</sub>Hex<sub>3</sub>HexNAc<sub>2</sub>), 1403 (dHex<sub>1</sub>Hex<sub>5</sub>HexNAc<sub>2</sub>), 1257 1419 (Hex<sub>5</sub>HexNAc<sub>2</sub>),  $(\text{Hex}_6\text{Hex}\text{NAc}_2),$ 1581 1743 (Hex<sub>8</sub>HexNAc<sub>2</sub>), and (Hex<sub>7</sub>HexNAc<sub>2</sub>), 1905  $(\text{Hex}_{9}\text{Hex}\text{NAc}_{2})$  were trimmed to  $\text{Hex}_{3}\text{Hex}\text{NAc}_{2}$  at m/z933 and  $Fuc_1Hex_3HexNAc_2$  at m/z 1079. In addition, the molecular ion at m/z 2067 (Hex<sub>10</sub>HexNAc<sub>2</sub>) was abolished, concomitant with the appearance of a new signal at m/z 1743  $(\text{Hex}_{8}\text{Hex}\text{NAc}_{2})$ . This new molecular ion is consistent with the loss of two  $\alpha$ -Man residues from the original molecular ion at m/z 2067 (Hex<sub>10</sub>HexNAc<sub>2</sub>). After  $\alpha$ -glucosidase II digestion, the molecular ion at m/z 1743 (Hex<sub>8</sub>HexNAc<sub>2</sub>) disappeared (data not shown), and a new ion was observed at m/z 1581 (Hex<sub>7</sub>HexNAc<sub>2</sub>), confirming then the presence of the evolutionary conserved glucosylated oligomannose-type glycan (Glc<sub>1</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>) on bovine LAMAN (Berg T, Hansen GM, et al., in preparation).

Linkage analysis of the PNGase F-released glycans from the bovine LAMAN. To identify the position of glycosidic bonds, PNGase F-released N-glycans from bovine LAMAN were permethylated (Ciucanu and Kerek, 1984), analyzed by MALDI-MS, and subjected to GC-MS analysis, as partially methylated alditol acetate derivatives, before and after sequential exoglycosidase digestions. According to the data summarized in Table II, some conclusions could be drawn which are as follows: (1) the abundant 2-linked Man indicates that most of the complex-type N-glycans are biantennary, but minor 2,4-branched Man and 2,6-branched Man suggest that minor tri- and/or tetraantennary structures are present; (2) Fuc, Gal, Man, and GlcNAc are the major nonreducing sugars, but minor terminal Glc was also detected; (3) the abundant terminal mannose is in accordance with high-mannose structures being the major components of the N-glycan population; (4) terminal Fuc and the 4,6-linked GlcNAc residues are consistent with the presence of core-fucosylated glycans; and (5) the high level of 3,4,6-linked Man indicates that most of the hybrid-type and/or the complex-type glycans are core bisected. After  $\beta$ -galactosidase treatment, terminal Gal disappeared, while a decrease of 4-linked GlcNAc was observed, indicating that nonreducing Gal residues were attached to the 4-position of the GlcNAc residues, prior to β-galactosidase digestion. Comparison of linkage data before and after  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidase treatment indicated that loss of terminal  $\beta$ -GlcNAc residues is accompanied by a

Table II.	Linkage analysis	s of partially	methylated ald	itol acetates
derivativ	es of the PNGase	F-released I	V-glycans from	bovine LAMAN

Elution time (min)	Characteristic fragment ions $(m/z)$	Assignment	Relative abundance
14.08 <sup>f</sup>	115, 118, 131, 162, 175	Terminal Fuc	0.05
18.44	102, 118, 129, 145, 161, 162, 205	Terminal Glc	0.05
18.52 <sup>c</sup>	102, 118, 129, 145, 161, 162, 205	Terminal Man	1
19.41 <sup>b</sup>	102, 118, 129, 145, 161, 162, 205	Terminal Gal	0.19
22.47	129, 130, 161, 190	2-linked Man	0.97
26.55	130, 190, 233	2,4-linked Man	0.01
28.23	129, 130, 189, 190	2,6-linked Man	0.01
28.49 <sup>c</sup>	118, 129, 189, 234	3,6-linked Man	0.44
30.15 <sup>d</sup>	118, 333	3,4,6-linked Man	0.3
31.13 <sup>a,d</sup>	117, 159, 203, 205	Terminal GlcNAc	0.41
33.43 <sup>e</sup>	117, 159, 233	4-linked GlcNAc	0.9
37.06 <sup>f</sup>	117, 159, 261	4,6-linked GlcNAc	0.11

<sup>a</sup>Signals more intense after treatment of *N*-glycans with  $\beta$ -galactosidase. <sup>b</sup>Signals not observed after treatment of *N*-glycans with  $\beta$ -galactosidase. <sup>c</sup>Signals more intense after treatment of *N*-glycans with

 $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidase. <sup>d</sup>Signals not observed after treatment of *N*-glycans with

 $\beta$ -N-acetylhexosaminidase.

Signals more intense after treatment of N-glycans with  $\alpha$ -fucosidase. <sup>f</sup>Signals not observed after treatment of *N*-glycans with  $\alpha$ -fucosidase.

decrease in 2-linked Man, 2,4-linked Man, 2,6-linked Man, and a concomitant increase in terminal Man. Besides, the 3,4,6-linked Man disappeared, and a concomitant increase of 3,6-linked Man was observed. These data indicate that GlcNAc residues were attached to the 4-position of the 3,4,6-linked Man and confirm the presence of core-bisected complex-type glycans and/or hybrid-type glycans. Comparison of linkage data before and after  $\alpha$ -fucosidase treatment indicated that loss of terminal Fuc is accompanied by a loss of the 4,6-linked GlcNAc and a concomitant increase of 4linked GlcNAc, indicating that Fuc residues were attached to the 6-position of the GlcNAc residues. These data support the presence of  $(\alpha 1, 6)$ -core fucosylation.

Assignment of the PNGase F-released glycans mixture of the bovine LAMAN. Taking into consideration MALDI-MS, linkage, and sequential exoglycosidase data, we conclude that the major glycans released from bovine LAMAN fall into three classes, namely oligomannose-type  $(Fuc_{0-1}Glc_{0-1}Man_{4-9}GlcNAc_2),$ hybrid-type ( $Gal_{0-1}Man_{4-5}GlcNAc_4$ ), and complex-type  $(Fuc_{0-1}Gal_{0-2}Man_3GlcNAc_{3-5})$  N-glycans (Figure 2). A minor monoglucosylated oligomannosidic N-glycan  $(Glc_1Man_0GlcNAc_2)$  is also present and is consistent with the evolutionary conserved structure among LAMANs (Berg T, Hansen GM, et al., in preparation). Highmannose structures are more abundant than hybrid and complex structures. The major complex-type oligosaccharides have compositions consistent with biantennary structures with a bisecting GlcNAc residue and/or triantennary structures without  $(\alpha 1, 6)$ -core fucosylation. The major nonreducing epitopes in the complex-type glycans are GlcNAc and Gal( $\beta$ 1–4)GlcNAc. The very low abundance of the minor compounds has to date precluded precise structural analysis.

#### O-glycosylation analysis

Reductive elimination on de-N-glycosylated peptides did not give any monosaccharides when analyzed by GC-MS analysis of the heptafluorobutyrate derivatives of the methyl glycosides (data not shown). Putative O-glycans were also permethylated, purified on a C18 Sep-Pak cartridge, and analyzed by MALDI-MS. No signals corresponding to O-glycans were observed (data not shown). Thus, we could find no evidence that O-linked glycans were an important component of the bovine LAMAN.

#### Strategy for investigating site-specific glycosylation of the bovine LAMAN

After elucidating the structures of the major PNGase Freleased *N*-glycans from the bovine LAMAN, the structure of the *N*-glycans at each glycosylation site has been determined. Bovine LAMAN consists of five peptide chains, namely a- to e-peptides, each containing one N-glycosylation site, except for the d-peptide that contains four N-glycosylation sites. To obtain information about the glycosylation within each peptide, peptide chains of the bovine LAMAN were electrophoretically separated according to their molecular weight, using SDS-PAGE. Bands of interest were excised, reduced, carboxamidomethylated, and in-gel deglycosylated by treatment with PNGase F, according to the procedure developed by Küster et al. (1997). After desalting on nonporous graphitized carbon solid-phase extraction cartridge, the extracted glycans were finally analyzed by MALDI-MS, before and after on-plate sequential exoglycosidase digestions. After ingel deglycosylation, identification of each peptide was confirmed by the use of in-gel tryptic digestion followed by MALDI-MS and matching of the mass fingerprint of the peptides obtained to a sequence database (ExPASy).

#### Glycosylation of the peptide chains of the bovine LAMAN using SDS-PAGE

The peptide chains of the reduced and carboxymethylated bovine LAMAN were first electrophoretically separated, using SDS-PAGE, followed by in-gel deglycosylation using PNGase F and MALDI-MS analysis of the extracted products, as described previously (Küster et al., 1997). The results of the SDS-PAGE obtained were in accordance with those obtained by Tollersrud and co-workers (1997). Figure 3A shows the different peptides constituting the bovine LAMAN. Because of their similar molecular mass, the a- and d-peptides were observed as a mixture. The abc-, c-, b-, and e-peptide chains were mostly well separated and showed a great heterogeneity due probably to the heterogeneity of their carbohydrate moieties. The abc-peptide originates from an incomplete proteolytic cleavage of the mature 110 kDa precursor of the bovine LAMAN (Nilssen et al., 1997; Tollersrud et al., 1997).

Figure 3B depicts the MALDI-MS spectrum of the in-gelreleased glycans from the unprocessed abc-peptide of the bovine LAMAN, which contains the  $N^{133}$ ,  $N^{367}$ , and  $N^{497}$ glycosylation sites. This spectrum is dominated by a strong signal at m/z 1257, corresponding to the Hex<sub>5</sub>HexNAc<sub>2</sub> high-mannose-type glycan, accompanied by lower signals



Fig. 2. Proposed structures for the major PNGase F-released *N*-glycans from bovine LAMAN. a, GlcNAc may be linked to either arm, forming a triantennary structure (1–4 or 1–6 linkage) or the core  $\beta$ -linked mannose to form a bisected structure (1–4 linkage). b, Gal may be attached to any arm.

at m/z 1403 (dHex<sub>1</sub>Hex<sub>5</sub>HexNAc<sub>2</sub>), 1419 (Hex<sub>6</sub>HexNAc<sub>2</sub>), 1542 (Hex<sub>3</sub>HexNAc<sub>5</sub>), 1581 (Hex<sub>7</sub>HexNAc<sub>2</sub>), 1663 (dHex<sub>1</sub>Hex<sub>3</sub>HexNAc<sub>5</sub>), 1704  $(\text{Hex}_5\text{Hex}\text{NAc}_4), 1688$ 1743  $(\text{Hex}_8\text{Hex}\text{NAc}_2),$ 1809  $(\text{Hex}_4\text{Hex}\text{NAc}_5),$ (dHex<sub>1</sub>Hex<sub>5</sub>HexNAc<sub>4</sub>), 1825 (Hex<sub>6</sub>HexNAc<sub>4</sub>), and 1850  $(dHex_1Hex_4HexNAc_5)$ . All these species were in agreement with those expected and summarized in Figure 2. Owing to its low abundance, the core-fucosylated hybrid structure (dHex<sub>1</sub>Hex<sub>5</sub>HexNAc<sub>4</sub>) was not detected in the total pool of PNGase F-released N-glycans and was only observed when the individual peptide chains were studied. The expected evolutionary conserved Glc<sub>1</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub> among LAMANs, which is located to the c-peptide, has not been detected because of its low abundance within the total pool of the abcpeptide-carried glycans. The N-glycans belong to the following three classes: high-mannose structures, hybrid structures, and complex-type structures. High-mannose structures are more abundant than hybrid-type structures and complex-type structures. The structures of the N-glycans were elucidated using on-target sequential exoglycosidase digestions (data not shown). The site-specific distribution of these structures cannot be elucidated since their respective peptide chains were unprocessed and then electrophoretically unseparated.

446

As depicted in Figure 3C, the MALDI-MS spectrum of the PNGase F-released oligosaccharides from the bands containing the mixed a- and d-peptides shows the presence of a great diversity of pseudomolecular ions  $[M+Na]^+$ , corresponding to a monosaccharide composition consistent with oligomannosidic (Hex<sub>5-9</sub>HexNAc<sub>2</sub>), hybrid (Hex<sub>4-6</sub>HexNAc<sub>4</sub>), and complex (Fuc<sub>0-1</sub>Hex<sub>3-5</sub>HexNAc<sub>3-5</sub>) structures. These structures are in keeping with those observed from the total pool of the *N*-glycans. These data indicate that most of the *N*-glycans of the bovine LAMAN are on the a- ( $N^{133}$ ) and d-( $N^{645}$ ,  $N^{651}$ ,  $N^{692}$ , and  $N^{766}$ ) peptides.

The MALDI-MS spectrum, depicted in Figure 3D, of the PNGase F-released glycans from the c-peptide, which only contains the  $N^{497}$  site, was dominated by a strong signal at m/z 1905, which is consistent with the monosaccharide composition of Hex<sub>9</sub>HexNAc<sub>2</sub>, accompanied by lower signals at m/z 1257 (Hex<sub>5</sub>HexNAc<sub>2</sub>), 1419 (Hex<sub>6</sub>HexNAc<sub>2</sub>), 1581 (Hex<sub>7</sub>HexNAc<sub>2</sub>), 1743 (Hex<sub>8</sub>HexNAc<sub>2</sub>), and 2067 (Hex<sub>10</sub>HexNAc<sub>2</sub>). These oligomannosidic structures were confirmed by MALDI-MS analysis after on-plate  $\alpha$ -mannosidase and  $\alpha$ -glucosidase II treatments (data not shown). These data indicate that the c-peptide of the bovine LAMAN contains glycans having compositions consistent



with high-mannose structures ( $Hex_{5-10}HexNAc_2$ ), including the evolutionary conserved  $Glc_1Man_9GlcNAc_2$  glycan.

The MALDI-MS spectrum (Figure 3E) of the oligosaccharides released by PNGase F from the e-peptide, containing the  $N^{930}$  site, yielded two major pseudomolecular ions  $[M+Na]^+$  at m/z 1079 and 1257, compatible with a corefucosylated trimannosyl structure dHex<sub>1</sub>Hex<sub>3</sub>HexNAc<sub>2</sub> and an oligomannosidic structure Hex5HexNAc2, respectively. Three other pseudomolecular ions  $[M + Na]^+$ were observed at m/z 1095 (Hex<sub>4</sub>HexNAc<sub>2</sub>), 1419 (Hex<sub>6</sub>HexNAc<sub>2</sub>), and 1403 (dHex<sub>1</sub>Hex<sub>4.6</sub>HexNAc<sub>2</sub>). The ingel-released oligosaccharides from the e-peptide were further submitted to on-plate sequential  $\alpha$ -fucosidase digestion followed by MALDI-MS analysis (Figure 3F). After this treatment, both components  $dHex_1Hex_3HexNAc_2$  (*m*/z 1079) and  $dHex_1Hex_5HexNAc_2$  (*m*/z 1403) were efficiently digested to Hex<sub>3</sub>HexNAc<sub>2</sub> (m/z 933) and Hex<sub>5</sub>HexNAc<sub>2</sub> (m/z 1257), respectively. Taking into consideration the linkage analysis data, these results suggest that dHex1Hex3HexNAc2 and dHex<sub>1</sub>Hex<sub>5</sub>HexNAc<sub>2</sub> are  $\alpha(1,6)$ -core fucosylated.

# Site-specific glycosylation of the bovine LAMAN using concanavalin A immobilized affinity chromatography

To identify the site-specific glycosylation at the remaining  $N^{133}$ ,  $N^{367}$ ,  $N^{645}$ ,  $N^{651}$ ,  $N^{692}$ , and  $N^{766}$  glycosylation sites, and to confirm the results obtained for the other *N*-glycosylation

sites, glycopeptides obtained by tryptic digestion of the reduced and carboxamidomethylated bovine LAMAN were enriched by Con A immobilized affinity chromatography. Con A agglutinin is a plant lectin which binds to highmannose-type and hybrid-type with high affinity. Complextype N-glycans are also weakly bound to this lectin. Two Con A-Sepharose-bound fractions were obtained. Lowaffinity fraction (F1), eluted with 10 mM  $\alpha$ -methylglucopyranoside, containing glycopeptides with complex-type N-glycans, and high-affinity fraction (F2), eluted with 500 mM  $\alpha$ -methylglucopyranoside, containing glycopeptides with oligomannosidic and hybrid-type N-glycans, were desalted on a C18 Sep-Pak cartridge. The glycopeptides from these fractions were finally separated by reversephase high-performance liquid chromatography (HPLC) (Figure 4). The fractions were collected, and each purified fraction was analyzed by MALDI-MS, in conjunction with on-target exoglycosidase digestions. Tryptic glycopeptides were then identified, based on theoretical masses of tryptic peptides from the reduced and carboxamidomethylated bovine LAMAN with various additional N-glycans. Based on MALDI-MS profiles, fractions F1-I and F1-II from the low-affinity (F1) and F2-I, F2-II, and F2-III from the highaffinity (F2) fractions bound by Con A-Sepharose correspond to glycopeptide fractions. Figures 5 and 6 show the MALDI mass spectra of fractions F1-I, F1-II, F2-I, F2-II, and F2-III. Subtraction of the calculated average mass of



Retention time (min)

Fig. 4. Reverse-phase HPLC profiles of both the low- (A) and high- (B) affinity fractions obtained by Con A immobilized affinity chromatography. Bovine LAMAN was reduced, carboxamidomethylated, and subjected to a tryptic digestion. The resulting peptide/glycopeptide mixture was then chromatographied on a Con A-Sepharose affinity column, and the bound glycopeptides were eluted into low F1 (A) and high F2 (B) affinity fractions, respectively with 10 and 500 mM  $\alpha$ -methylglucopyranoside. Con A-purified tryptic glycopeptides from each affinity fraction were fractionated using reverse-phase HPLC on an XTerra MS C<sub>18</sub> (2.1 × 150 mm; 3.5 µm) column equilibrated in 0.1% (v/v) TFA at a flow rate of 0.125 mL/min, and the elution profile was followed by monitoring at 214 nm. The glycopeptide-containing fractions are indicated as F1-I, F1-II, F2-I, F2-III, and F2-III.



Fig. 5. MALDI-MS spectra of the glycopeptides from the reverse-phase HPLC fractions F2-II before (A), after  $\alpha$ -mannosidase treatment (B), and combined  $\alpha$ -mannosidase and  $\alpha$ -fucosidase (C) treatment. Native glycopeptides and digested products were analyzed, respectively as  $[M+H]^+$  and  $[M+Na]^+$ molecular ions in positive ion reflective mode. The monosaccharide compositions were deduced by subtraction of the calculated average mass of the predicted tryptic peptide from the average molecular mass of the observed glycopeptides. The compositional assignment of the molecular ions is listed in Table III. The carbohydrate structures correspond with those previously elucidated and summarized in Figure 2.



**Fig. 6.** MALDI-MS spectra of the glycopeptides F1-I (**A**), F1-II (**B**), F2-I (**C**), F2-III (**D**). Low and high Con A-Sepharose affinity fractions were fractionated by reverse-phase HPLC, and the resulted fractions were analyzed by MALDI-MS. Glycopeptides were analyzed as  $[M+H]^+$  and  $[M+Na]^+$  molecular ions in positive ion reflective mode. The compositional assignment of the molecular ions is listed in Table III. Glycopeptides from the F1-I (**A**) and the F2-I (**C**) fractions were identified to contain the  $N^{766}$  glycosylation site and the F1-II (**B**) and the F2-III (**D**) fractions, the  $N^{692}$  glycosylation site.

the predicted tryptic peptide from the average molecular mass of the glycopeptides observed provided the oligosaccharide residue compositions, summarized in Table III. As expected for most of them, the monosaccharide compositions of glycopeptides were consistent with those identified by the MALDI-MS analysis of the PNGase F-released glycans from the bovine LAMAN (Table I). However, the site-specific glycosylation, within the  $N^{766}$  and  $N^{692}$  glycosylation sites, for example, indicated the presence of some minor additional structures like dHex<sub>1</sub>Hex<sub>4</sub>HexNAc<sub>2</sub> (*m*/*z* 3125) and dHex<sub>1</sub>Hex<sub>6</sub>HexNAc<sub>4</sub> (*m*/*z* 4277) not listed in Table I.

To confirm the structure of their carbohydrate moiety, each glycopeptide was subjected to on-plate sequential exoglycosidase digestions, followed by MALDI-MS analysis, as illustrated in the case of glycopeptide from fraction F2-II in Figure 5. Finally, amino acid sequence of each glycopeptide was then obtained, after their deglycosylation using PNGase F, by nanoESI-MS/MS analysis (Figure 7).

For example, the MALDI-MS spectrum of the native glycopeptide from the high-affinity fraction F2-II, bound to Con A-Sepharose, depicted in the Figure 5A, shows molecular ions  $[M+H]^+$  at m/z 1797, 1943, 1959, 2121, 2267, and 2283, spaced by dHex units (146 Da) and by Hex units (162 Da). These signals were assignable to the predicted tryptic peptide  ${}^{366}ANLSWSVK{}^{373}$  with additional high-mannose structures, having compositions Hex<sub>3</sub>HexNAc<sub>2</sub> (m/z 1797), dHex<sub>1</sub>Hex<sub>3</sub>HexNAc<sub>2</sub> (m/z 1943),  $\text{Hex}_4\text{HexNAc}_2$  (*m*/*z* 1959),  $\text{Hex}_5\text{HexNAc}_2$  (*m*/*z* (m|z)dHex<sub>1</sub>Hex<sub>5</sub>HexNAc<sub>2</sub> 2121), 2267), and  $Hex_6HexNAc_2$  (*m*/z 2283). To confirm the structure of the carbohydrate moiety, the glycopeptide was submitted to on-plate sequential exoglycosidase digestions, using  $\alpha$ mannosidase and/or  $\alpha$ -fucosidase, followed by MALDI-MS (Figure 5B and C). After,  $\alpha$ -mannosidase treatment, molecular ions [M+H]<sup>+</sup> at *m/z* 1943, 1959, 2121, 2267, and 2283 disappeared, with a concomitant increase of protonated species  $[M+H]^+$  at m/z 1797 (dHex1Hex2HexNAc2) and a concomitant appearance of protonated species  $[M+H]^+$  at m/z 1634 (Hex<sub>2</sub>HexNAc<sub>2</sub>), 1618 (dHex<sub>1</sub>Hex<sub>1</sub>HexNAc<sub>2</sub>), and 1472 (Hex<sub>1</sub>HexNAc<sub>2</sub>). This experiment confirmed that all glycoforms present on the  $N^{367}$  glycosylation site corresponded to oligomannosetype N-glycans. These results are in good agreement with the results obtained by Tollersrud et al. (1997). Moreover, the protonated species  $[M+H]^+$  at m/z 1618 (dHex<sub>1</sub>Hex<sub>1</sub>HexNAc<sub>2</sub>) and 1802 (dHex<sub>1</sub>Hex<sub>2</sub>HexNAc<sub>2</sub>) corresponded to products from the digestion of fucosylated high-mannose structures. To confirm the presence of a fucose residue, glycoforms of the tryptic peptide <sup>366</sup>ANLSWSVK<sup>373</sup> were then digested using  $\alpha$ -mannosidase and  $\alpha$ -fucosidase. As depicted in the MALDI-MS spectrum of the Figure 5C, molecular ions  $[M+H]^+$  at m/z 1618 and  $[M+Na]^+$  at m/z 1802 disappeared. Taking into consideration the linkage analysis data, these results indicate that both molecular species at m/z 1943 (dHex<sub>1</sub>Hex<sub>3</sub>HexNAc<sub>2</sub>) and 2267 (dHex<sub>1</sub>Hex<sub>5</sub>HexNAc<sub>2</sub>) were core fucosylated. Then, to identify the glycosylation site, the glycopeptide from the high-affinity fraction F2-II was deglycosylated using PNGase F, and the resulting aglycone was analyzed by nanoESI-MS/MS. The product ion spectrum CID-MS/MS

(Figure 7) obtained from the nanoESI-MS spectrum was dominated by an intense signal at m/z 905 and is consistent with the theoretical mass of the predicted tryptic peptide <sup>366</sup>ADLSWSVK<sup>373</sup>, containing the  $N^{367}$  glycosylation site. The parent ion was selected by the quadrupole and was subsequently fragmented in the collision cell, under 40 eV as collision energy. The CID-MS/MS spectrum in Figure 7 shows two series of singly charged B- and Y-type fragment ions, which fit to the theoretical masses of the product ions calculated from the predicted sequence <sup>366</sup>ADLSWSVK<sup>373</sup> containing the  $N^{367}$  glycosylation site. The asparagine residue was converted to an aspartic acid residue after PNGase F treatment.

Using the same experiments, site-specific glycosylation within the  $N^{766}$  and  $N^{692}$  glycosylation sites from the dpeptide of the bovine LAMAN was also determined, and both sites were occupied by broad glycan heterogeneity, since the corresponding glycopeptides were found in both the low- and high-affinity fractions. Figure 6A and C depicts MALDI-MS spectra of the native glycopeptides, containing the  $N^{766}$  site, isolated from the F1-I and F2-I affinity fractions, respectively. MALDI-MS spectrum of the native glycopeptides from the F1-I fraction (Figure 6A) is dominated by a strong signal at m/z 3545, corresponding to the predicted tryptic sequence <sup>765</sup>LNQTEPVAGNYYPVNSR<sup>781</sup> with additional Hex5HexNAc4 structure. About 10 molecular ions were also observed and correspond to the same predicted tryptic peptide with additional structures, ranging from agalactosylated biantennary to core-fucosylated and bisected biantennary structures, and/or triantennary structures. This result is consistent with the low affinity of the Con A lectin for the complex-type N-glycans. The MALDI-MS spectrum of the native glycopeptides from the F2-I fraction (Figure 6C) shows three strong signals at m/z 3141, 3303, and 3545. These molecular ions correspond to the predicted tryptic peptide <sup>765</sup>LNQTEPVAGNYYPVNSR<sup>781</sup> with additional Hex5HexNAc2, Hex6HexNAc2, and Hex5HexNAc4, respectively. About eight minor molecular species were also observed and correspond to the same peptide with additional high-mannose-type (dHex<sub>0-1</sub>Hex<sub>3-7</sub>HexNAc<sub>2</sub>) and hybridtype (Hex<sub>4-6</sub>HexNAc<sub>4</sub>) N-glycans. The molecular species at m/z 3545 consists in the major component within the  $N^{766}$ site, since it is found with high abundance in both the highand low-affinity fractions. All these structures were confirmed by on-target exoglycosidase digestions (data not shown).

The site-specific glycosylation within the  $N^{692}$  site has also been determined after MALDI-MS analysis of both the F1-II (Figure 6B) and F2-III (Figure 6D) affinity fractions, containing glycopeptides bearing the predicted amino acid sequence  $^{683}$ ASLVQEVHQ*N*FSAWCSQVVR<sup>702</sup>. The MALDI-MS spectrum, depicted in Figure 6B, has two main species at m/z 3848 and 4010, corresponding to the predicted peptide attached respectively to agalactosylated and galactosylated bisected biantennary glycan. It is important to note that these molecular ions can also correspond to the predicted peptide attached to minor triantennary structures. Minor molecular ions were also observed and were consistent with biantennary glycoforms, ranging from agalactosylated to core-fucosylated and bisected structures, and/or triantennary structures, with two terminating

#### Table III. Compositional assignment of the tryptic glycopeptides

Fraction	Amino acid sequence of the tryptic glycopeptide	Theoretical monoisotopic masses $[M+H]^+$ of the tryptic peptide aglycone $(m/z)$	Compositional assignment	Observed masses $[M+H]^+ (m/z)$
F1-I	$^{765}L^{766}NR^{781}$	1922	Hex <sub>3</sub> HexNAc <sub>2</sub>	2814
			Hex <sub>3</sub> HexNAc <sub>4</sub>	3220
			dHex <sub>1</sub> Hex <sub>3</sub> HexNAc <sub>4</sub>	3367
			$Hex_4HexNAc_4$	3382
			Hex <sub>3</sub> HexNAc <sub>5</sub>	3423
			dHex <sub>1</sub> Hex <sub>4</sub> HexNAc <sub>4</sub>	3529
			Hex <sub>5</sub> HexNAc <sub>4</sub>	3545
			dHex <sub>1</sub> Hex <sub>3</sub> HexNAc <sub>5</sub>	3568
			Hex <sub>4</sub> HexNAc <sub>5</sub>	3585
			dHex <sub>1</sub> Hex <sub>4</sub> HexNAc <sub>5</sub>	3732
			Hex <sub>5</sub> HexNAc <sub>5</sub>	3748
			dHex <sub>1</sub> Hex <sub>5</sub> HexNAc <sub>5</sub>	3894
F1-II	${}^{683}\text{A}^{692}N\text{R}^{702}$	2345	Hex <sub>3</sub> HexNAc <sub>4</sub>	3645
			Hex <sub>4</sub> HexNAc <sub>4</sub>	3761
			Hex <sub>3</sub> HexNAc <sub>5</sub>	3791
			Hex <sub>5</sub> HexNAc <sub>4</sub>	3807
			Hex <sub>3</sub> HexNAc <sub>5</sub>	3848
			Hex <sub>5</sub> HexNAc <sub>4</sub>	3969
			Hex <sub>4</sub> HexNAc <sub>5</sub>	4010
			dHex <sub>1</sub> Hex <sub>4</sub> HexNAc <sub>5</sub>	4156
			Hex <sub>5</sub> HexNAc <sub>5</sub>	4172
			dHex <sub>1</sub> Hex <sub>5</sub> HexNAc <sub>5</sub>	4318
F2-I	$^{765}L^{766}NR^{781}$	1922	Hex <sub>2</sub> HexNAc <sub>2</sub>	2815
			Hex <sub>4</sub> HexNAc <sub>2</sub>	2978
			dHex <sub>1</sub> Hex <sub>4</sub> HexNAc <sub>2</sub>	3125
			Hex <sub>5</sub> HexNAc <sub>2</sub>	3141
			dHex <sub>1</sub> Hex <sub>5</sub> HexNAc <sub>2</sub>	3287
			Hex <sub>6</sub> HexNAc <sub>2</sub>	3303
			$Hex_4 Hex NAc_4$	3383
			Hex <sub>7</sub> HexNAc <sub>2</sub>	3464
			Hex <sub>5</sub> HexNAc <sub>4</sub>	3545
			Hex <sub>4</sub> HexNAc <sub>5</sub>	3586
			Hex <sub>6</sub> HexNAc <sub>4</sub>	3709
F2-II	<sup>366</sup> A <sup>367</sup> NK <sup>373</sup>	905	Hex <sub>3</sub> HexNAc <sub>2</sub>	1797
			dHex <sub>1</sub> Hex <sub>3</sub> HexNAc <sub>2</sub>	1943
			$Hex_4HexNAc_2$	1959
			Hex <sub>5</sub> HexNAc <sub>2</sub>	2121
			dHex <sub>1</sub> Hex <sub>5</sub> HexNAc <sub>2</sub>	2267
			Hex <sub>6</sub> HexNAc <sub>2</sub>	2283
F2-III	<sup>683</sup> AQ <sup>692</sup> NR <sup>702</sup>	2345	Hex <sub>3</sub> HexNAc <sub>2</sub>	3240
	-		Hex <sub>4</sub> HexNAc <sub>2</sub>	3402
			Hex <sub>5</sub> HexNAc <sub>2</sub>	3564
			Hex <sub>6</sub> HexNAc <sub>2</sub>	3726
			Hex <sub>5</sub> HexNAc <sub>3</sub>	3767
			Hex <sub>4</sub> HexNAc <sub>4</sub>	3808
			•	

Table III. c	continued
--------------	-----------

Fraction	Amino acid sequence of the tryptic glycopeptide	Theoretical monoisotopic masses $[M+H]^+$ of the tryptic peptide aglycone $(m/z)$	Compositional assignment	Observed masses $[M+H]^+ (m/z)$
			Hex <sub>3</sub> HexNAc <sub>5</sub>	3849
			Hex5HexNAc4	3970
			dHex <sub>1</sub> Hex <sub>3</sub> HexNAc <sub>5</sub>	3995
			Hex <sub>4</sub> HexNAc <sub>5</sub>	4011
			Hex <sub>8</sub> HexNAc <sub>2</sub>	4052
			Hex <sub>6</sub> HexNAc <sub>4</sub>	4132
			dHex1Hex6HexNAc4	4277



Mass (m/z)

Fig. 7. CID-MS/MS mass spectrum of the parent ion at m/z 905, corresponding to the peptide moiety of the glycopeptide from the fraction F2-I. The glycopeptide from the fraction F2-I was deglycosylated using PNGase F The peptidic aglycone was then purified on C18 Zip-tip and analyzed by nanoESI-MS/MS under 40 eV as collision energy. The parent ion corresponds to the predicted mass of the tryptic peptide <sup>366</sup>ANLSWSVK<sup>373</sup> containing the N<sup>367</sup> glycosylation site. The N<sup>367</sup> residue was transformed in aspartic residue after PNGase F treatment.

galactose. The MALDI-MS analysis of the glycoforms from the F2-III affinity fraction (Figure 6D) showed the presence of abundant and heterogenous high-mannose-type glycans ( $\text{Hex}_{4-8}\text{HexNAc}_2$ ) and hybrid-type glycans ( $\text{dHex}_{0,1}\text{Hex}_{4-6}\text{HexNAc}_4$ ). The presence of the original structure dHex<sub>1</sub>Hex<sub>6</sub>HexNAc<sub>4</sub> was not detected because of its low abundance within the total pool of PNGase Freleased *N*-glycans. These structures were also confirmed by on-target exoglycosidase digestions (data not shown).

No tryptic glycopeptides, corresponding to the  $N^{645}$  and  $N^{651}$  glycosylation sites ( $^{639}$ QAFYWYNASTGNNLSSQASGAYIFRPNQNKPL FVSHWAQTHLVK $^{682}$ ), from the d-peptide of bovine LAMAN, were found by the analysis of both affinity fractions. Therefore, the Con A-unretained material was also fractionated using reverse-phase HPLC, and the fractions were analyzed by MALDI-MS. No glycopeptides corresponding to these sites were found, suggesting that these sites may be unglycosylated or sparsely glycosylated.

# Distribution of the major PNGase F-released N-glycans at each N-glycosylation site

Taking into consideration mass spectrometric data obtained from the analysis of each peptide chain of the bovine LAMAN and tryptic Con A-Sepharose-enriched glycopeptides, we conclude that (1) most glycosylation sites are occupied by a broad diversity of carbohydrates; (2) the  $N^{645}$  and  $N^{651}$ , from the d-peptide, appear to be sparsely glycosylated or unglycosylated; (3) The  $N^{367}$  site, from the b-peptide chain, is only glycosylated with oligomannosidic structures (Fuc<sub>0-1</sub>Man<sub>3-5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>); (4) the  $N^{497}$ site, from the c-peptide, is only occupied by high-mannose structures (Glc<sub>0-1</sub>Man<sub>5-9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>), including the evolutionary

conserved Glc<sub>1</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub> glycan; (5)  $N^{692}$  and  $N^{766}$  sites from the d-peptide chain both bear glycans consisting in oligomannosidic (Man<sub>3-7</sub>GlcNAc<sub>2</sub>), hybrid (Fuc<sub>0-1</sub>Gal<sub>0-1</sub>Man<sub>4-5</sub>GlcNAc<sub>4</sub>), and complex (Fuc<sub>0-1</sub>Gal<sub>0-2</sub>Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>4-5</sub>) structures; and (6) the  $N^{930}$ , from the e-peptide, contains only oligomannosidic-type glycans (Fuc<sub>0-1</sub>Man<sub>3-5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>).

type glycans (Fuc<sub>0-1</sub>Man<sub>3-5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>). With respect to the  $N^{133}$ , from the a-peptide, site-specific glycosylation can be conducted, taking into consideration the data obtained from the analysis of the in-gel-released glycans from the abc- and c-peptides and the tryptic glycopeptide containing the  $N^{367}$  site, belonging to the b-peptide. Indeed, among the pool of in-gel-released glycans from the abc-peptide (Figure 3B), complex- (Fuc<sub>0-1</sub>Gal<sub>0-1</sub>Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>5</sub>) and hybrid-type (Fuc<sub>0-1</sub>Gal<sub>0-1</sub>Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>4</sub>) *N*-glycans were present, while they were not found on both the  $N^{497}$  and  $N^{367}$  sites (Figures 3D and 5A). These structures can be assigned to the  $N^{133}$  glycosylation site. Besides, Tollersrud *et al.* (1997) demonstrated that the *N*-glycans on the  $N^{133}$  glycosylation site can be released using the endoH enzyme. Thus, the  $N^{133}$  site (a-peptide) is glycosylated as represented in Scheme 2, which also illustrates the site-specific distribution of the major PNGase F-released glycans from the bovine LAMAN within each glycosylation site.

#### Discussion

Most secretory and membrane-bound proteins produced by mammalian cells contain covalently linked oligosaccharide chains. Carbohydrate moieties can play important structural and functional roles in a glycoprotein such as immunogenicity, solubility, protein conformation, molecular recognition, intracellular trafficking, or protease resistance (Varki, 1993; Helenius and Aebi, 2001, 2004; Trombetta, 2003). They are involved in the proper folding of the newly synthesized nascent proteins within the ER, by interacting with the components of the control quality machinery (for reviews see Spiro, 2002; Helenius and Aebi, 2004; Trombetta and Parodi, 2005). It has been reported that glycosylation could also be essential for lysosomal stability and activity in some lysosomal hydrolases by maintaining correct protein conformation (Ferlinz et al., 2001; Wujek et al., 2004; Berg T, Hansen GM, et al., in preparation).

We have used bovine LAMAN as an interesting model for understanding the human glycoprotein as well as the pathophysiology of its defect-related disease, namely  $\alpha$ mannosidosis. This enzyme was shown to be glycosylated, and seven of the eight *N*-glycosylation sites were site occupied (Tollersrud *et al.*, 1997; Heikinheimo *et al.*, 2003). Apart from mediating lysosomal sorting and transport



Scheme 2. Proposed structures of the N-linked oligosaccharides at Asn-133, Asn-367, Asn-497, Asn-692, Asn-766, and Asn-930 from bovine LAMAN.
(Tollersrud et al., 1997; Heikinheimo et al., 2003) or maintaining lysosomal stability (Berg T, Hansen GM, et al., in preparation), the putative functions associated with its carbohydrates remained unknown. As a first step toward elucidation of N-glycan functions, we have initiated the complete structural elucidation of the major *N*-glycans as well as their site-specific distribution at each N-glycosylation site of bovine LAMAN. In this study, we first determined the structure of all N-linked glycans of the bovine LAMAN, summarized in Figure 2, as the major structures to be released by PNGase F. The major structures fall into three classes, namely highmannose-type (Fuc<sub>0-1</sub>Glc<sub>0-1</sub>Man<sub>4-9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>), hybrid-type  $(Gal_{0-1}Man_{4-5}GlcNAc_4)$ , and complex-type  $(Fuc_{0-1}Gal_{0-2})$  $Man_3GlcNAc_{3-5}$ ) N-glycans, with or without core fucosylation and with or without bisecting GlcNAc (Figure 2). A minor monoglucosylated high-mannose N-glycan (Glc<sub>1</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>) was also described and is consistent with the evolutionary conserved structure among LAMANs. High-mannose structures are more abundant than hybrid and complex structures. The major complextype oligosaccharides have compositions consistent with biantennary structures with a bisecting GlcNAc residue or triantennary structures without  $(\alpha 1, \overline{6})$ -core fucosylation. The major nonreducing epitopes in the complex-type glycans are GlcNAc and Gal( $\beta$ 1–4)GlcNAc. Thus, in the lysosomal environment of the bovine LAMAN, the oligosaccharides may undergo degradation to shorter chains. Indeed, since the high-mannose glycans represent potential substrates for the enzyme itself, some of the truncated and high-mannose glycans ( $Fuc_{0-1}Man_{3-5}GlcNAc_{2}$ ) may not represent native structures and may arise from high-mannose structures with a greater number of mannose residues. For example, truncated high-mannose structure Man<sub>4</sub>GlcNAc<sub>2</sub> may be essentially obtained from LAMANdigested hybrid-type Man<sub>4-5</sub>GlcNAc<sub>4</sub> structures, which further lose their GlcNAc-terminated residues. This hypothesis is confirmed by the presence of core fucosylation on both Man<sub>4</sub>GlcNAc<sub>2</sub> and Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub> structures, which requires an unsubstituted GlcNAc residue ( $\beta$ 1,4)linked to the  $\alpha$ -Man residue of the ( $\alpha$ 1,3)-antennae of the *N*-glycan for the transfer (Harpaz and Schachter, 1980; Kornfeld and Kornfeld, 1985). Although ( $\alpha$ 1,6)-core fucosylation appears to be a terminal event occurring exclusively on complex or hybrid structures, there is growing evidence that core-fucosylated high-mannose structures can also occur in mammalian cells (Lin et al., 1994; Endo et al., 1996; Hoja-Lukowicz et al., 2000). In fact, some lysosomal glycoproteins, including porcine LAMAN, typically possessing a high content of high-mannose structures, were shown to carry core-fucosylated high-mannose-type Nglycans (Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub> and smaller) (Howard et al., 1982; Takahashi et al., 1983, 1984; Taniguchi et al., 1985; Kozutsumi et al., 1986; Maley et al., 1989). Finally, the Fuc<sub>0.1</sub>Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub> structures arise in the final catabolic products from the aspecific lysosomal exoglycosidase action on the native glycans. Also, no 6-phosphomannosyl high-mannose glycans, as the recognition signal for lysosomal proteins, were found among PNGase F-released Nglycans, probably due to their cleavage by lysosomal phosphatases.

The occurrence of high-mannose glycans, including the rare Glc1Man9GlcNAc2 structure, stably carried on a mannosidase, suggests that they may play some critical function for the proper protein folding as well as stability against proteolysis, as demonstrated on jack bean  $\alpha$ -mannosidase (Kimura et al., 1999). Indeed, Kimura and co-workers have shown that the high-mannose structures, including Glc<sub>1</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>, could only be removed by endoH, under denaturing conditions; this last observation suggests that these glycans were buried within the folded polypeptide and, thus, protected from its hydrolytic activity. When the high-mannose-type glycans were removed by endoH prior to renaturation, recovery of  $\alpha$ -mannosidase activity failed, indicating that this glycan appears to be important for enzyme activity. Additionally, monoglucosylated N-glycan on the lepidopteran hemolymph arylphorin storage protein could not be released under native conditions by PNGase F (Kim et al., 2003). This last observation indicates that the structures were protein buried and thus protected against enzymatic activity. These observations confirm the role for this glycan as structural anchor for maintenance of the protein folding, promoting for example a high stability against proteolysis. The presence of monoglucosylated N-glycans in mature secreted glycoproteins suggests that these oligosaccharides are located in a protein region for which folding does not depend on calnexin/calreticulin lectin chaperones. This localization would prevent the removal of terminal glucose residue by ER- $\alpha$ -glucosidase II (for reviews see Spiro, 2002; Helenius and Aebi, 2004; Trombetta and Parodi, 2005).

Bovine LAMAN has previously been shown to contain eight potential N-glycosylation sites ( $N^{133}$ ,  $N^{367}$ ,  $N^{497}$ ,  $N^{645}$ ,  $N^{651}$ ,  $N^{692}$ ,  $N^{766}$ , and  $N^{930}$ ), most of them being glycosylated (Tollersrud et al., 1997). In this study, we characterized the site-specific glycosylation of the bovine enzyme, analyzing each individual electrophoretically separated peptide chain and tryptic glycopeptides. The  $N^{133}$ ,  $N^{367}$ ,  $N^{497}$ , and  $N^{930}$  glycosylation sites were not fully occupied, as judged by the results of SDS-PAGE (Figure 3A), which revealed the presence of both nonglycosylated and glycosylated forms of a-, b-, c-, and e-peptides. It is important to note that due to the low amount of protein sample available, and in view of the complexity of the structural studies of bovine LAMAN, no quantitative data with respect to the relative abundance of each glycan or the level of site occupancy of the six glycosylation sites have been generated. This is the first report on site-specific glycosylation analysis on a LAMAN. For all eight potential N-glycosylation sites, our results indicate that six are glycosylated, namely  $N^{133}$ ,  $N^{367}$ ,  $N^{497}$ ,  $N^{692}$ ,  $N^{766}$ , and  $N^{930}$  (Scheme 2). However, we cannot exclude that the  $N^{645}$  and  $N^{651}$  of the peptide d are glycosylated. Structures deduced at these glycosylation sites were in agreement with those previously identified and summarized in Figure 2.

The  $N^{367}$  (b-peptide) and  $N^{930}$  (e-peptide) glycosylation sites are only glycosylated with truncated (Fuc<sub>0-1</sub>Man<sub>3-4</sub> GlcNAc<sub>2</sub>) and high-mannose structures (Fuc<sub>0-1</sub> Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>). The occurrence of truncated and small highmannose structures indicates that these glycans are located at the surface of the enzyme, as all putative  $\alpha$ -mannosyl residues from high-mannose structures were trimmed, as previously observed for some lysosomal glycoproteins (Howard *et al.*, 1982; Takahashi *et al.*, 1983, 1984; Taniguchi *et al.*, 1985; Kozutsumi *et al.*, 1986; Maley *et al.*, 1989; Kimura *et al.*, 1999). These structures, or those from which they were derived, were hypothesized to be potential sites for lysosomal sorting. The  $N^{692}$  and  $N^{766}$  sites of the d-peptide show a broad

The  $N^{692}$  and  $N^{766}$  sites of the d-peptide show a broad microheterogeneity, resembling that of total PNGase Freleased glycans from bovine LAMAN (Figure 1A, Scheme 2). These glycosylation sites bear glycans comprising in high-mannose (Fuc<sub>0-1</sub>Man<sub>3-7</sub>GlcNAc<sub>2</sub>), hybrid (Fuc<sub>0-1</sub>Gal<sub>0-1</sub>Man<sub>4-5</sub>GlcNAc<sub>4</sub>), and complex (Fuc<sub>0-1</sub> Gal<sub>0-2</sub>Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>4-5</sub>) structures. Both these sites therefore represent the only sites bearing a majority of complex-type glycans, suggesting that these were surface exposed within the molecule, thus allowing accessibility of the oligosaccharides to various processing enzymes, including glycosidases as well as transferases, during the biosynthesis of the LAMAN. However, the  $N^{766}$  glycosylation site has been also hypothesized to be in the main site for lysosomal sorting (Heikinheimo *et al.*, 2003). *N*-glycosylation site  $N^{497}$  (c-peptide) is conserved among

all known LAMANs from mammalian to plants and was found to be fully glycosylated and occupied by Glc<sub>0.1</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub> glycans. This site was reported to be mainly occupied by Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub> and Glc<sub>1</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub> structures (Berg T, Hansen GM, et al., in preparation). Although our results confirmed the presence of these structures, smaller high-mannose structures  $Man_{5-8}GlcNAc_2$ were shown to be present. These  $N^{497}$ -carried glycans were postulated to play a key role as a structural anchor for LAMANs. These high-mannose-type structures were shown to rest against the 3-helix bundle, joining b- and c-peptides (Heikinheimo et al., 2003). This configuration then reduces protein flexibility and allows a higher stability against pro-teolysis. Glycosylation site  $N^{497}$  and the two proximate cysteines (C<sup>493</sup> and C<sup>501</sup>) form a β-hairpin loop and were shown to be very important for the maintenance of lysosomal stability in LAMANs. These cysteine residues are essential for the formation of the Glc<sub>0.1</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub> structure (Berg T, Hansen GM, et al., in preparation). Moreover, an identical structural organization has also been described on a cathepsin Z-related protein; it is composed of a highmannose-type glycan associated with a surface-exposed peptide  $\beta$ -hairpin loop (Appenzeller-Herzog *et al.*, 2005). This pattern appears to be essential for the capture of secretory glycoproteins within the ER to target them at the ERGIC compartment through the COP II pathway.

The  $N^{133}$  glycosylation site was shown to be glycosylated with a majority of hybrid-type (Fuc<sub>0-1</sub>Gal<sub>0-1</sub>Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>4</sub>) glycans with a low amount of truncated and high-mannose-type (Fuc<sub>0-1</sub>Man<sub>4-5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>), complextype (Fuc<sub>0-1</sub>Gal<sub>0-1</sub>Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>5</sub>) glycans. These structures can also be related to their topology within the polypeptide backbone. Indeed, this site should be surface exposed within bovine LAMAN to allow accessibility of the oligosaccharides to the ER- and Golgi-related processing enzymes, leading to the biosynthesis of core-fucosylated hybrid-type and complex-type glycans during LAMAN biosynthesis. This observation could also account for the low abundance of truncated and high-mannose structures within this site. Moreover, this surface-exposed location of  $N^{133}$  was previously shown through the three-dimensional structure of bovine LAMAN, solved by Heikinheimo and co-workers (2003). They have indeed shown that the  $N^{133}$  glycosylation site is located within a surface-exposed  $\beta$ -turn between two helices and hypothesized a putative involvement of its carbohydrates in the proper folding of the enzyme.

*N*-glycans can be crucial for several biological processes and collectively ensure the proper operation of lysosomal hydrolases. The well-known implication is that of lysosomal targeting of acid hydrolases. The well-characterized sorting mechanism for lysosomal proteins is based on a selected phosphorylation of  $\alpha$ -mannosyl residue(s) of highmannose structures by the UDP-N-acetylglucosamine: N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase glycoprotein (phosphotransferase), followed by subsequent transport to lysosomes by Man-6-P receptors (MPRs) (for reviews see Kornfeld and Mellman, 1989; Kornfeld, 1990; Dahms and Hancock. 2002). Recognition of the site for lysosomal sorting by phosphotransferase was suggested to require distant lysine residues (Metcalf and Fusek, 1993), and the structural pattern in cathepsins suggests a separation of 34 Å between two lysine residues (Cuozzo et al., 1998). However, a small number of lysosomal enzymes, such as acid phosphatase (Waheed et al., 1988), cathepsin D, glucocerebrosidase, sphingolipid-activating protein (Rijnboutt et al., 1991), and  $\alpha$ -glucosidase (Wisselaar *et al.*, 1993) have been shown to reach lysosomes by an MPR-independent pathway under normal conditions. It has recently been hypothesized that LAMAN may be sorted and carried to lysosomes via an MPR-independent pathway under normal conditions, as may be judged by its routing to lysosomes in NH<sub>4</sub>Cl-treated cells (data not published). Moreover, it has been shown that all  $N^{367}$ ,  $N^{766}$ , and  $N^{930}$  glycosylation sites were located on the same side of the molecule and are about 40 Å apart within a positively charged region (Heikinheimo et al., 2003). This region consists of two groups of evolutionary conserved lysines among LAMANs and mainly surrounds the  $N^{766}$  glycosylation site. This observation confirms that these sites should be potential sites for phosphorylation and lysosomal sorting.

The detailed glycosylation pattern of bovine LAMAN, determined in this study, in combination with data from the elucidation of its three-dimensional structure, conducted by Heikinheimo *et al.* (2003), provides insights into the involvement of carbohydrate structures in the biological and biochemical properties of LAMANs.

#### Materials and Methods

#### Materials

Bovine LAMAN was purified as described previously (Tollersrud *et al.*, 1997). Recombinant peptidyl-*N*-glycosidase F (PNGase F; EC 3.5.1.52) from *Escherichia coli* was purchased from Roche Molecular Biochemicals (Indianapolis, IN). Sequencing-grade modified trypsin (EC 3.4.21.4) was purchased from Promega (Madison, WI). Jack bean  $\alpha$ -mannosidase (EC 3.2.1.24), bovine testis  $\beta$ -galactosidase (EC 3.2.1.23), and bovine kidney  $\alpha$ -fucosidase (EC

3.2.1.51) were purchased from Sigma Chemicals (St. Louis, MO). Jack bean  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidase (EC 3.2.1.30) was purchased for Calbiochem (La Jolla, CA). Con A-Sepharose 4B was obtained from Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden). Sodium cyanoborohydride, dimethylsulfoxide, and iodomethane were from Fluka (Buchs, Switzerland). Dithiothreitol (DTT) and iodoace-tamide (IAA) were from Bio-Rad (Hercules, CA). Sodium borodeuteride and 2,5-dihydroxybenzoïc acid were purchased from Sigma Chemicals. Methanol, acetonitrile, and trifluoroacetic acid (TFA) were HPLC reagent grade. All aqueous solutions were prepared using ultra-pure water.

#### Monosaccharide composition analysis

An aliquot of 10 µg of bovine LAMAN was methanolyzed with 0.5 mL methanolic HCl 0.5 M for 16 h at 80°C. After evaporation under a stream of nitrogen, the released methyl glycosides were dissolved in 200 µL anhydrous acetonitrile and peracylated by adding 25 µL heptafluorobutyric anhydride, the reaction being conducted at 150°C for 30 min. After evaporation under a stream of nitrogen, the perheptafluorobutyryl-1-*O*-methylglycosides were dissolved in anhydrous acetonitrile and then analyzed by gas chromatography (GC) on a Shimatzu instrument equipped with a 25 m × 0.32 mm CP-Sil5 CB Low bleed/MS capillary column and 0.25 µm film phase (Chrompack France, Les Illis, France). The samples were analyzed using a linear gradient of  $1.2^{\circ}$ C/min from 100 to 140°C (Zanetta *et al.*, 1999).

#### Reduction and carboxymethylation

An aliquot of 2 mg of bovine LAMAN was dissolved in 1 mL of 0.6 M Tris/HCl pH 8.2 and denatured by 6 M guanidine hydrochloride. The sample was incubated at 50°C for 30 min. The sample was reduced using a fourfold molar excess of DTT over the number of disulfide bridges. The sample was flushed with argon and incubated at 50°C for 5 h. After addition of IAA (5 molar excess over the DTT), the sample was flushed with argon and incubated overnight in the dark at room temperature. The sample was then extensively dialyzed against 50 mM ammonium bicarbonate at 4°C and lyophilized.

#### Tryptic digestion

The tryptic digestion of DTT-reduced carboxymethylated LAMAN was carried out in 100 mM ammonium bicarbonate buffer (pH 8.4) containing trypsin with an enzyme-tosubstrate ratio of 1:50 (w/w). The enzyme reaction was incubated for 24 h at 37°C. The reaction was terminated by boiling for 5 min before lyophilization.

# Isolation of tryptic glycopeptides by Con A immobilized affinity chromatography

To isolate the *N*-glycopeptides, the tryptic digest from the reduced carboxamidomethylated bovine LAMAN was loaded onto Con A-Sepharose 4B column (2 mL) equilibrated in buffer A (5 mM sodium acetate pH 4.5, 100 mM NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MnCl<sub>2</sub>, and 1 mM MgCl<sub>2</sub>). After washing with 20 mL of buffer A, the low-affinity *N*-glycopeptides were eluted with 20 mL of buffer B (Buffer A +

10 mM  $\alpha$ -methylglucopyranoside), and the high-affinity glycopeptides were eluted with 20 mL of buffer C (Buffer A + 0.5 M  $\alpha$ -methylglucopyranoside). Both fractions F1 and F2 eluted respectively with buffers B and C were lyophilized and desalted on a C18 Sep-Pak cartridge.

# *Reverse-phase HPLC separations of the tryptic glycopeptides*

The Con A-purified tryptic glycopeptides were fractionated using reverse-phase HPLC on an XTerra MS  $C_{18}$  (2.1 × 150 mm; 3.5 µm) column. The column was equilibrated with 0.1% (v/v) TFA. After injection, isocratic conditions were applied for 10 min, with the initial solvent, followed by a linear gradient to 80% (v/v) acetonitrile in 0.1% (v/v) TFA for 180 min. The flow rate was 0.125 mL/min and at absorbance was measured at 214 nm. The collected fractions were lyophilized.

#### PNGase F-digestion of tryptic glycopeptides

PNGase F-digestion was performed in 50 mM ammonium bicarbonate buffer pH 8.4 at 37°C for 24 h. The reaction was terminated by lyophilization, and the products were purified on a C18 Sep-Pak (Waters, Milford, MA) to separate the *N*-glycans from the de-*N*-glycosylated peptides. After conditioning the C18 Sep-Pak by sequential washing with methanol (5 mL), water (5 mL), acetonitrile (5 mL), and 0.1% (v/v) TFA (2× 5 mL), the sample, dissolved in 0.1% (v/v) TFA, was loaded onto the C18 Sep-Pak, and the glycans were eluted with 3 mL of 0.1% (v/v) TFA. The released oligosaccharides were then lyophilized.

#### Reductive elimination

Putative *O*-glycopeptides remaining after PNGase F-digestion of the tryptic glycopeptides were subjected to reductive elimination according the procedure developed by Carlson (1968). After terminating the reaction with glacial acetic acid, the sample was purified on a column ( $7 \times 0.5$  cm) of Dowex 50 (8X; H<sup>+</sup> form), and the unbound material was then lyophilized. Borate salts were removed by several evaporations with methanol containing 5% (v/v) acetic acid.

#### Clean-up procedure PNGase F-released N-glycans

The released *N*-glycans were desalted on columns of 150 mg of nonporous graphitized carbon (Alltech, Deerfield, IL) according to the procedure described previously (Packer *et al.*, 1998). The columns were sequentially washed with 5 mL methanol and  $2 \times 5$  mL 0.1% (v/v) TFA. The glycans were dissolved in 300 µL of 0.1% (v/v) TFA, applied to the column, and washed with  $2 \times 5$  mL of 0.1% (v/v) TFA. The elution of glycans was conducted with the application of 5 mL of 60% (v/v) acetonitrile in water containing 0.1% (v/v) TFA. The fractions were freeze-dried.

#### Permethylation of PNGase F-released N-glycans

Permethylation using the sodium hydroxide procedure was performed according to Ciucanu and Kerek (1984). After derivatization, the reaction products were further purified on a C18-Sep-Pak. The C18 Sep-Pak was sequentially conditioned with methanol (5 mL), water (5 mL), acetonitrile (5 mL), and water (5 mL). The derivatized glycans dissolved in methanol were applied on the cartridge, washed with  $3 \times 5$  mL water, 2 mL of 10% (v/v) acetonitrile in water, and eluted with 3 mL of 80% (v/v) acetonitrile in water. Acetonitrile was evaporated under a stream of nitrogen, and the sample was freeze-dried.

#### Linkage analysis

The permethylated oligosaccharides were hydrolyzed in 500 µL of 4 M TFA at 100°C for 4 h. After removing the acid, the permethylated compounds were then reduced at room temperature overnight by adding 200 µL of 2 M ammonia solution containing sodium borodeuteride (5 mg/mL). The reduction was terminated by adding acetic acid, and borates were eliminated under a stream of nitrogen in the presence of methanol containing 5% (v/v) acetic acid. After adding 50  $\mu$ L of pyridine and 200  $\mu$ L of acetic anhydride, peracetylation of the samples was conducted at 100°C for 2 h. After evaporation under a stream of nitrogen, the partially methylated alditol acetates (PMAA) were dissolved in chloroform, and the chloroform phase was washed 10 times with water. This PMAA-containing phase was finally dried under a stream of nitrogen, and the PMAA were dissolved in methanol GC-MS analysis. GC separation of PMAA was performed using a Carbo Erba GC 8000 gas chromatograph fitted with a 25 m  $\times$  0.32 mm CP-Sil5 CB Low bleed capillary column, 0.25 µm film phase (Chrompack France, Les Upis Cedex, France). The temperature of the Ross injector was 260°C. Samples were analyzed using a temperature program starting by a gradient of 2°C/min from 130 to 180°C, after 2 min at 130°C, followed by a gradient of 4°C/min until 240°C. The column was coupled to a Finnigan Automass II mass spectrometer. Analyses were performed in the electron impact mode using an ionization energy of 70 eV. Quantification of the various PMAA derivatives was carried out using total ion current (TIC) of the MS detector in positive ion mode.

#### Sequential exoglycosidase digestions

These were carried out on PNGase F-released glycans onto the MALDI sample plate according to the procedure developed by Mechref and Novotny (1998) and in corollary in-solution using the following enzymes and conditions:  $\beta$ galactosidase, 10 mU in 50 mM ammonium formate pH 4.6;  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidase, 0.2 U in 200 µL of 50 mM ammonium formate pH 4.6, and  $\alpha$ -mannosidase, 0.5 U in 200 µl of 50 mM ammonium acetate buffer, pH 4.5. All enzyme digestions were incubated at 37°C for 48 h with a fresh aliquot of enzyme being added after 24 h and terminated by boiling for 10 min before lyophilization. An appropriate aliquot was taken after each digestion and permethylated for MALDI-MS and GC-MS analysis.

#### SDS-PAGE of bovine LAMAN

An aliquot of bovine LAMAN was denaturated in a Laemmli buffer at 100°C for 10 min and run on 12.5% gel (18  $\times$  20 cm), as described previously (Laemmli, 1970). The electrophoresis was conducted in the running buffer (25 mM Tris/190 mM glycine/0.1% (w/v) SDS), using a PROTEAN II xi CELL (Bio-Rad) under constant current (20 mA for stacking step, 35 mA for running step). The gel was then fixed, stained with a Coomassie Brilliant Blue R-250 dye for 15 min, and partially destained with a methanol-acetic acid-water (25:7:68; v/v/v) overnight.

# *Processing of peptides LAMAN-corresponding bands excised from gels*

The Coomassie-stained bands were excised from the gel using a sterile scalpel and transferred into 0.5 mL microcentrifuge tubes (Eppendorff). Each excised gel piece was further destained by washing several times with the two following solutions: 50 mM ammonium bicarbonateacetonitrile (1:1, v/v) and acetonitrile for 20 min. The solution was then removed, and the gel pieces were dehydrated with acetonitrile for 20 min. After removing acetonitrile, the gel pieces were left to dry in a vacuum centrifuge for 30 min at room temperature. Each gel piece was further suspended in a 50 mM ammonium bicarbonate containing 20 mM DTT. Peptides-corresponding bands were then reduced at 56°C for 45 min. After having removed the DTT-containing supernatant, each gel piece was suspended with a 50 mM ammonium bicarbonate containing 110 mM of IAA and S-alkylation conducted overnight in the dark at room temperature. The alkylant reagent-containing solution was removed, and the gel pieces were washed several times in 100 mM ammonium bicarbonate for 20 min. The gel pieces were finally dehydrated with acetonitrile and dried in the vacuum centrifuge for 45 min.

#### In-gel PNGase F-digestion

The dried gel pieces were rehydrated in 20 mM ammonium bicarbonate buffer (pH 8.3) containing 1 U of PNGase F, and the enzymatic deglycosylation was performed at 37°C overnight. The PNGase F-released *N*-glycans were eluted from the gel pieces with water three times for 20 min. The pooled extracted glycans were dried in a vacuum centrifuge and then desalted on minicolumns of 10 mg of nonporous graphitized carbon. The columns were sequentially washed with 1 mL of methanol and  $2 \times 1$  mL of 0.1% (v/v) TFA. The glycans were dissolved in 300 µL of 0.1% (v/v) TFA, applied to the column, and washed with  $2 \times 1$  mL of 0.1% (v/v) TFA. The elution of glycans was conducted with the application of 1 mL of 60% (v/v) acetonitrile in water containing 0.1% (v/v) TFA. The fractions were dried in a vacuum centrifuge.

#### In-gel trypsin digestion and extraction of peptides

The dried gel pieces were suspended with a 50 mM ammonium bicarbonate containing 5 mM CaCl<sub>2</sub> and trypsin with an enzyme-to-substrate ratio of 1:50 (w/w) and incubated at 37°C overnight. The enzymatic reaction was terminated in boiling water for 10 min, and the tryptic peptides were extracted from gels once with 25 mM ammonium bicarbonate, twice with 45% (v/v) acetonitrile in water containing 5% (v/v) formic acid, and once with 95% (v/v) acetonitrile in water containing 5% (v/v) formic acid for 20 min. The pooled extracted peptides were dried in a vacuum centrifuge. The isolated tryptic peptides were dissolved in 0.1% (v/v) TFA, and an aliquot was desalted using reverse-phase C18 Zip-Tip (Millipore). The C18 Zip-Tip was sequentially equilibrated with methanol, 0.1% (v/v) TFA, and the tryptic peptides were loaded onto. After washing with 0.1% (v/v) TFA, the elution was carried out in a 0.5 mL microcentrifuge tube (Eppendorff) containing 10 µL of 80% (v/v) acetonitrile in water containing 0.1% (v/v) TFA.

# Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry

MALDI-MS experiments were carried out on Voyager Elite DE-STR Pro instrument (PersSeptive Biosystem, Framingham, MA) equipped with a pulsed nitrogen laser (337 nm) and a gridless delayed extraction ion source. The spectrometer was operated in positive reflectron mode by delayed extraction with an accelerating voltage of 20 kV and a pulse delay time of 200 nsec and a grid voltage of 66%. All spectra shown represent accumulated spectra obtained by 400–500 laser shots. Sample was prepared by mixing a 1  $\mu$ L aliquot (5–10 pmoles) with 1  $\mu$ L of matrix solution on the MALDI sample plate. The matrix solution was prepared by saturating methanol–water (1:1) with 2,5 dihydroxybenzoic acid (DHB) (10 mg/mL).

The on-target sequential exoglycosidase digestions were performed on desalted samples (glycopeptides and glycans), dissolved with ultra-pure water at 5-10 pmoles/µL. An aliquot of 1 µL of each sample was spotted on the MALDI sample plate and reconstituted in 1  $\mu$ L of reaction buffer (10 mM sodium phosphate, pH 6.5). For enzymatic sequencing, several enzyme arrays, used in combination or not, were added on each spotted sample according to the following procedure: α-glucosidase, 150 mU; α-mannosidase, 23.75 mU; β-galactosidase, 1.25 mU; β-N-acetylhexosaminidase, 150 mU; α-fucosidase, 7.7 mU. The MALDI plate was then placed in a crystallization beaker containing water at 37°C for 8 h. The enzymatic reactions were terminated by the addition of 1 µL of a matrix solution (DHB), and the samples were analyzed by matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF/MS).

# *Electrospray tandem mass spectrometry* (nano ESI-MS/MS)

All analyses were performed using a Q-STAR Pulsar quadrupole time-of-flight (Q-TOF) mass spectrometer (Applied Biosystems/MDS Sciex, Toronto, Ontario, Canada) fitted with a nanoelectrospray ion source (Protana, Odense, Denmark). Derivatized glycans, dissolved in a solution of 80% (v/v) methanol and 1% (v/v) acetic acid and peptides, dissolved in an equal volume of methanol-water containing 0.1% (v/v) formic acid (5 fmoles/µL) were sprayed from a gold-coated "medium-length" borosilicate capillaries (Protana). A potential of 800 V was applied to the capillary tip, and the focusing potential was set at -100 V, the declustering potential varying between -60 and -110 V. For the recording of conventional mass spectra, time-of-flight data were acquired by accumulation of 50 MCA (multiple channel acquisition) scans. For generation of MS/ MS data, the parent ion was selected by the quadrupole and was subsequently fragmented in the collision cell using nitrogen at a pressure of about  $5.3 \times 10^{-5}$  Torr and a appropriate collision energy. The CID spectra were recorded by the orthogonal TOF analyzer over a range of m/z 100–2000. For the recording of CID spectra, time-of-flight data were acquired by accumulation of 60 MCA scans.

#### Acknowledgments

This research was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (Unité Mixte de Recherche CNRS/ USTL 8576; Director: Dr Jean-Claude Michalski), the Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur. The Mass Spectrometry facility used in this study was funded by the European Community (FEDER), the Région Nord-Pas de Calais (France), and the Université des Sciences et Technologies de Lille.

#### Conflict of interest statement

None declared.

#### Abbreviations

Con A, concanavalin A; DHB, 2,5 dihydroxybenzoic acid; ER, endoplasmic reticulum; HPLC, high-performance liquid chromatography; LAMAN, lysosomal α-mannosidase.

#### References

- Appenzeller-Herzog, C., Nyfeler, B., Burkhard, P., Santamaria, I., Lopez-Otin, C., and Hauri, H.P. (2005) Carbohydrate- and conformation-dependent cargo capture for ER-exit. *Mol. Biol. Cell.*, 16, 1258–1267.
- Aronson, N.N. Jr and Kuranda, M.J. (1989) Lysosomal degradation of Asn-linked glycoproteins. FASEB J., 3, 2615–2622.
- Berg, T., Healy, P.J., Tollersrud, O.K., and Nilssen, Ø. (1997) Molecular heterogeneity for bovine alpha-mannosidosis: PCR based assays for detection of breed-specific mutations. *Res. Vet. Sci.*, 63, 279–282.
- Berg, T. and Hopwood, J.J. (2001) α-mannosidosis in the guinea pig: cloning of the lysosomal α-mannosidase cDNA and identification of a missense mutation causing α-mannosidosis. *Biochim. Biophys. Acta*, **1586**, 169–176.
- Berg, T., King, B., Meikle, P.J., and Nilssen, Ø. (2001) Purification and characterization of recombinant human lysosomal α-mannosidase. *Mol. Genet. Metab.*, **73**, 18–29.
- Berg, T., Riise, H.M.F., Hansen, G.M., Malm, D., Tranebjaerg, L., Tollersrud, O.K., and Nilssen, Ø. (1999) Spectrum of mutations in αmannosidosis. Am. J. Hum. Genet., 64, 77–88.
- Berg, T., Tollersrud, O.K., Walkley, S.U., Siegel, D., and Nilssen, Ø. (1997) Purification of feline lysosomal α-mannosidase, determination of its cDNA, sequence and identification of a mutation causing α-mannosidosis in Persian cats. *Biochem. J.*, **328**, 863–870.
- Carlson, D.M. (1968) Structures and immunochemical properties of oligosaccharides isolated from pig submaxillary mucin. J. Biol. Chem., 243, 616–626.
- Cheng, S.H., Malcolm, S., Pemble, S., and Winchester, B. (1986) Purification and comparison of the structures of human liver acidic alpha-Dmannosidases A and B. *Biochem. J.*, 233, 65–72.
- Ciucanu, I. and Kerek, F. (1984) A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydr. Res.*, **131**, 209–217.
- Crispin, M.D., Ritchie, G.E., Critchley, A.J., Morgan, B.P., Wilson, I.A., Dwek, R.A., Sim, R.B., and Rudd, P.M. (2004) Monoglucosylated glycans in the secreted human complement component C3: implications for protein biosynthesis and structure. *FEBS Lett.*, **566**, 270–274.
- Cuozzo, J.W., Tao, K., Cygler, M., Mort, J.S., and Sahagian, G.G. (1998) Lysine-based structure responsible for selective mannose phosphorylation of cathepsin D and cathepsin L defines a common structural motif for lysosomal enzyme targeting. J. Biol. Chem., 273, 21067–21076.

- Dahms, N.M. and Hancock, M.K. (2002) P-type lectins. Biochim. Biophys. Acta, 1572, 317–340.
- Daniel, P.F., Winchester, B., and Warren, C.D. (1994) Mammalian  $\alpha$ mannosidases-multiple forms but a common purpose. *Glycobiology*, **4**, 551–566.
- Endo, T., Fujiwara, T., Ikehara, Y., and Kobata, A. (1996) Comparative study of the sugar chains of alkaline phosphatases purified from rat liver and rat AH-130 hepatoma cells. Occurrence of fucosylated high-mannose type and hybrid type sugar chains. *Eur. J. Biochem.*, **236**, 579–590.
- Ferlinz, K., Kopal, G., Bernardo, K., Linke, T., Bar, J., Breiden, B., Neumann, U., Lang, F., Schuchman, E.H., and Sandhoff, K. (2001) Human acid ceramidase: processing, glycosylation, and lysosomal targeting. J. Biol Chem., 276, 35352–35360.
- Gotoda, Y., Wakamatsu, N., Kawai, H., Nishida, Y., and Matsumoto, T. (1998) Missense and nonsense mutations in the lysosomal gene (MANB) in severe and mild forms of  $\alpha$ -mannosidosis. *Am. J. Genet.*, **63**, 1015–1024.
- Hansen, G.M., Berg, T., Riise, H.M.F., Heikinheimo, P., Klenow, H., Evjen, G., Nilssen, Ø., and Tollersrud, O.K. (2004) Intracellular transport of human lysosomal α-mannosidase and α-mannosidosis-related mutants. *Biochem. J.*, 381, 537–546.
- Harpaz, N. and Schachter, H. (1980) Control of glycoprotein synthesis. Processing of asparagine-linked oligosaccharides by one or more rat liver Golgi alpha-D-mannosidases dependent on the prior action of UDP-N-acetylglucosamine: alpha-D-mannoside beta, 2-N-acetylglucosaminyltransferase I. J. Biol. Chem. 255, 4894–4902.
- Heikinheimo, P., Helland, R., Leiros, H.K.S., Leiros, I., Karlsen, S., Evjen, G., Ravelli, R., Shoehn, G., Ruigrok, R., Tollersrud, O.K., and others (2003) The structure of bovine lysosomal α-mannosidase suggests a novel mechanism for low-pH activation. J. Mol. Biol., 327, 631–644.
- Helenius, A. and Aebi, M. (2001) Intracellular functions of N-linked glycans. Science, 291, 2364–2369.
- Helenius, A. and Aebi, M. (2004) Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. Annu. Rev. Biochem., 73, 1019–1049.
- Henrissat, B. and Bairoch, A. (1993) New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.*, 293, 781–788.
- Hoja-Lukowicz, D., Ciolczyk, D., Bergquist, J., Litynska, A., and Laidler, P. (2000) High-mannose-type oligosaccharides from human placental arylsulfatase A are core fucosylated as confirmed by MALDI MS. *Glycobiology*, 6, 551–557.
- Howard, D.R., Natowicz, M., and Baenziger, J.U. (1982) Structural studies of the endoglycosidase H-resistant oligosaccharides present on human  $\beta$ -glucuronidase. J. Biol. Chem., **257**, 10861–10868.
- Howard, S., Braun, C., McCarter, J., Moremen, K.W., Liao, Y.F., and Withers, S.G. (1997) Human lysosomal and Jack bean α-mannosidases are retaining glycosidases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 238, 896–898.
- Kim, S., Hwang, S.K., Dwek, R.A., Rudd, P.M., Ahn, Y.H., Kim, E.H., Cheong, C., Kim, S.I., Park, N.S., and Lee, S.M. (2003) Structural determination of the N-glycans of a lepidopteran arylphorin reveals the presence of a monoglucosylated oligosaccharide in the storage protein. *Glycobiology*, **13**, 147–157.
- Kimura, Y., Hess, D., and Sturm, A. (1999) The N-glycans of jack bean alpha-mannosidase. Structure, topology and function. *Eur J Biochem.*, 264, 168–175.
- Kornfeld, R. and Kornfeld, S. (1985) Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. Annu. Rev. Biochem., 54, 631–664.
- Kornfeld, S. (1990) Lysosomal enzyme targeting. *Biochem. Soc. Trans.*, 18, 367–374.
- Kornfeld, S. and Mellman, I. (1989) The biogenesis of lysosomes. Annu. Rev. Cell Biol., 5, 483–525.
- Kozutsumi, Y., Nakao, Y., Teramura, T., Kawasaki, T., Yamashina, L., Mutsaeres, J.H.G.M., Van Halbeek, H., and Vliegenthart, J.F.G. (1986) Structures of oligomannoside chains of α-mannosidase from porcine kidney. J. Biochem. (Tokyo), 99, 1253–1265.
- Küster, B., Wheeler, S.F., Hunter, A.P., Dwek, R.A., and Harvey, D.J. (1997) Sequencing of N-linked oligosaccharides directly from protein gels: in-gel deglycosylation followed by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry and normal-phase high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.*, 250, 82–101.

- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 270, 680–685.
- Liao, Y.F., Lal, A., and Moremen, K.W. (1996) Cloning, expression, purification, and characterization of the human broad specificity lysosomal acid alpha-mannosidase. J. Biol. Chem., 271, 28348–28358.
- Lin, A.I., Philipsberg, G.A., and Haltiwanger, R.S. (1994) Core fucosylation of high-mannose-type oligosaccharides in GlcNAc transferase Ideficient (Lec1) CHO cells. *Glycobiology*, 4, 895–901.
- Maley, F., Trimble, R.B., Tarentio, A.L., and Plummer, T.H. (1989) Characterization of glycoproteins and their associated oligosaccharides through the use of endoglycosidases. *Anal. Biochem.*, 180, 195–204.
- Mechref, Y. and Novotny, M.V. (1998) Mass spectrometric mapping and sequencing of N-linked oligosaccharides derived from submicrogram amounts of glycoproteins. *Anal. Chem.*, 70, 455–463.
- Metcalf, P. and Fusek, M. (1993) Two crystal structures for cathepsin D: the lysosomal targeting signal and active site. *EMBO J.*, 12, 1293–1302.
- Michalski, J.C. (1996) Normal and pathological catabolism of glycoproteins: catabolic pathway. In *Glycoproteins and Disease. New Comprehensive Biochemistry*. Elsevier Science, Vol. 30, pp. 55–88.
- Michalski, J.C. and Klein, A. (1999) Glycoprotein lysosomal storage disorders: alpha- and beta-mannosidosis, fucosidosis and alpha-N-acetylgalactosaminidase deficiency. *Biochim. Biophys. Acta*, 1455, 69–84.
- Moremen, K.W., Trimble, R.B., and Herscovics, A. (1994) Glycosidases of the asparagine-linked oligosaccharide processing pathway. *Glycobiology*, 4, 113–125.
- Nilssen, Ø., Berg, T., Riise, H.M.F., Ramachandran, U., Evjen, G., Hansen, G., Malm, D., Tranebjñrg, L., and Tollersrud, O.K. (1997) αmannosidosis: functional cloning of the lysosomal α-mannosidase cDNA and identification of a mutation in two affected siblings. *Hum. Mol. Genet.*, **6**, 717–726.
- Packer, N.H., Lawson, M.A., Jardine, D.R., and Redmond, J.W. (1998) A general approach to desalting oligosaccharides released from glycoproteins. *Glycoconj. J.*, 15, 737–747.
- Parodi, A.J. (2000) Protein glucosylation and its role in protein folding. Annu. Rev. Biochem., 69, 69–93.
- Pohlmann, R., Hasilik, A., Cheng, S., Pemble, S., Winchester, B., and von Figura, K. (1983) Synthesis of lysosomal alpha-mannosidase in normal and mannosidosis fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 115, 1083–1089.
- Riise, H.M.F., Berg, T., Nilssen, Ø., Romeo, G., Tollersrud, O.K., and Ceccherini, I. (1997) Genomic structure of the human lysosomal αmannosidase gene (MANB). *Genomics*, 42, 200–207.
- Rijnboutt, S., Kal, A.J., Geuze, H.J., Aerts, H., and Strous, G.J. (1991) Mannose, 6-phosphate-independent targeting of cathepsin D to lysosomes in HepG2 cells. J. Biol. Chem., 266, 23586–23592.
- Rudd, P.M. and Dwek, R.A. (1997) Rapid, sensitive sequencing of oligosaccharides from glycoproteins. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 8, 488–497.
- Spiro, R.G. (2002) Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiol*ogy, **12**, 43–56.
- Takahashi, T., Schmidt, P.L., and Tang, J. (1983) Oligosaccharide units of lysosomal cathepsin D from porcine spleen. Amino acid sequence and carbohydrate structure of the glycopeptides. J. Biol. Chem., 258, 2819–2830.
- Takahashi, T., Schmidt, P.L., and Tang, J. (1984) Novel carbohydrate structures of cathepsin B from porcine spleen. J. Biol. Chem., 259, 6059–6062.
- Taniguchi, T., Mizuochi, T., Towatari, T., Katunuma, N., and Kobata, A. (1985) Structural studies on the carbohydrate moieties of rat liver cathepsins B and H. J. Biochem. (Tokyo), 97, 973–976.
- Thomas, G.H. and Beaudet, A.L. (1995) *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. McGraw-Hill, New York, pp. 2529–2561.
- Tollersrud, O.K., Berg, T., Healy, P.J., Evjen, G., Ramachandran, U., and Nilssen, Ø. (1997) Purification of bovine lysosomal  $\alpha$ -mannosidase, characterization of its gene and determination of two mutations that cause  $\alpha$ -mannosidosis. *Eur. J. Biochem.* **246**, 410–419.
- Trombetta, E.S. (2003) The contribution of N-glycans and their processing in the endoplasmic reticulum to glycoprotein biosynthesis. *Glycobiology*, **13**, 77–91.
- Trombetta, E.S. and Parodi, A.J. (2005) Glycoprotein reglucosylation. *Methods*, **35**, 328–337.

- Tsuji, A. and Suzuki, Y. (1987) Purification of human placental acid alpha-mannosidase by an immunological method. *Biochem. Int.*, 15, 483–489.
- Varki, A. (1993) Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology*, 3, 97–130.
- Waheed, A., Gottschalk, S., Hille, A., Krentler, C., Pohlmann, R., Braulke, T., Hauser, H., Geuze, H., and von Figura, K. (1988) Human lysosomal acid phosphatase is transported as a transmembrane protein to lysosomes in transfected baby hamster kidney cells. *EMBO J.*, 7, 2351–2358.
- Wisselaar, H.A., Hermans, M.M., Visser, W.J., Kroos, M.A., Oostra, B.A., Aspden, W., Harrison, B., Hetzel, D.J., Reuser, A.J., and

Drinkwater, R.D. (1993) Biochemical genetics of glycogenosis type II in Brahman cattle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **190**, 941–947.

- Wujek, P., Kida, E., Walus, M., Wisniewski, K.E., and Golabek, A.A. (2004) N-glycosylation is crucial for folding, trafficking, and stability of human tripeptidyl-peptidase I. J. Biol. Chem., 279, 12827–12839.
- Zanetta, J.P., Timmerman, P., and Leroy, Y. (1999) Gas-liquid chromatography of the heptafluorobutyrate derivatives of the O-methyl-glycosides on capillary columns: a method for the quantitative determination of the monosaccharide composition of glycoproteins and glycolipids. *Glycobiology*, **3**, 255–266.

## **3- DISCUSSION**

Notre travail de thèse a consisté à établir la structure détaillée et le positionnement sur chaque site des glycannes majeurs de la bLAMAN. Les N-glycannes majeurs sont de type : (1) oligomannosidique (Fuc<sub>0-1</sub>Glc<sub>0-1</sub>Man<sub>4-9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>), dont le noyau de certains d'entre eux étant ( $\alpha$ 1-6)-fucosylé ; (2) hybride (Gal<sub>0-1</sub>Man<sub>4-5</sub>GlcNAc<sub>4</sub>), dont le noyau de certains d'entre eux étant substitué par un résidu de GlcNAc intercalaire ; et (3) complexe (Fuc<sub>0-1</sub>Gal<sub>0-2</sub>Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>3-5</sub>), avec des structures majoritairement biantennées dont le noyau est ( $\alpha$ 1-6)-fucosylé et substitué par un résidu de GlcNAc intercalaire.

Compte tenu des diverses activités hydrolasiques et du bas pH régnant dans le lysosome, aucune structure porteuse du signal Man-6-P n'a pu être détectée et certains glycannes constitueraient des produits de catabolisme partiel des structures matures, formées dans l'appareil de Golgi. En effet, puisque les glycannes de type oligomannosidique constituent les substrats potentiels de la bLAMAN, certaines des structures oligomannosidiques tronquées ou à chaîne courte (Man<sub>3-5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>) ne constitueraient pas les glycannes initialement présents sur la bLAMAN, avant son entrée dans le lysosome, qui devaient vraisemblablement renfermer un plus grand nombre de résidus de Man. De plus, ces structures pourraient également résulter d'une dégradation par la β-galactosidase et les N-acétyl-β-hexosaminidases de structures nativement hybrides mono- et/ou biantennées. Cette hypothèse est confirmée par la fucosylation en (a1-6) du résidu de GlcNAc proximal des structures tétra-/pentamannosidiques (Fuc<sub>0-1</sub>Man<sub>3-5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>), qui requiert, comme nous l'avions vu en première partie de l'exposé bibliographique, la formation d'une antenne (\beta1-2)-Nacétylglucosaminyl sur la branche ( $\alpha$ 1-3)-mannosidique du noyau pentasaccharidique, catalysée par la GlcNAc T I (Schachter, 1995, 2000). De nombreux travaux ont rapporté la présence de N-glycannes de type oligomannosidique à chaîne courte (Man<sub>4-6</sub>GlcNAc<sub>2</sub>) à noyau (α1-6)-fucosylé sur un grand nombre de glycoprotéines lysosomales de mammifères (Maley et al., 1989), telles que la cathepsine D splénique porcine (Takahashi et al., 1983; Nakao et al., 1984), la cathepsine B splénique porcine (Takahashi et al., 1984), les cathepsines B et H hépatiques de rat (Taniguchi *et al.*, 1985), la β-glucuronidase humaine (Howard *et al.*, 1982), l'arylsulfatase A placentaire humaine (Hoja-Lukowicz et al., 2000) et la LAMAN porcine (Kozutsumi et al., 1986). Cependant, d'autres travaux ont ensuite démontré la possibilité pour les cellules CHO déficientes en GlcNAc T I de catalyser la fucosylation en (α1-6) du noyau des N-glycannes de type oligomannosidique (Lin *et al.*, 1994 ; Crispin *et al.*, 2006). Ces résultats démontrent que la fucosylation en ( $\alpha$ 1-6) des N-glycannes de type oligomannosidique par la FUT VIII suit une voie GlcNAc T I-indépendante, et qu'une grande part des structures oligomannosidiques à noyau ( $\alpha$ 1-6)-fucosylé, détectées sur la bLAMAN, a été synthétisée au cours de son trafic dans l'appareil de Golgi.

Nos travaux ont également montré la présence de structures oligomannosidiques complètes  $(Glc_{0-1}Man_9GlcNAc_2)$ , incluant la structure immature monoglucosylée, qui constitue un signal de rétention réticulaire, reconnus par les lectines chaperonnes calnexine/calréticuline. La présence de telles structures, non affectées par les activités mannosidasiques lysosomales, suggère qu'elles jouent un rôle important aussi bien dans le repliement protéique que dans la résistance vis-à-vis des activités protéasiques de l'endosome tardif et du lysosome. Kimura et al. (1999) ont pu montrer que certains N-glycannes oligomannosidiques, dont la structure immature Glc1Man9GlcNAc2, présents sur la LAMAN de Jack bean, n'étaient éliminés qu'en conditions dénaturantes. Cette observation suggère que ces structures sont cryptées dans une région protéique repliée, qui, en conditions non dénaturantes, a empêché l'action de l'endoglycosidase. De plus, la renaturation, qui fait suite à la dénaturation et à la déglycosylation enzymatique des N-glycannes oligomannosidiques, ne permet pas de recouvrer un enzyme actif, suggérant l'importance de ces glycannes pour l'activité enzymatique de la LAMAN de Jack bean. La même expérience a été appliquée à l'arylphorine de l'hémolymphe de lépidoptère, dont le N-glycanne immature Glc<sub>1</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub> n'a pu être éliminé par la PNGase F en conditions non dénaturantes (Kim et al., 2003). Cette observation indique que cette structure était cryptée dans une région protéique repliée qui a empêché l'accès de la PNGase F au site de glycosylation. Ces résultats expliquent la présence de structures oligomannosidiques complètes, incluant la structure immature Glc1Man9GlcNAc2, qui, contractant des interactions avec certains domaines secondaires, agit comme une ancre structurale nécessaire au repliement protéique et à la stabilisation de la conformation protéique. Ceci explique également l'incapacité de l' $\alpha$ glucosidase II, comme de l' $\alpha$ -mannosidase réticulaire I, à dégrader ces structures immatures, compte tenu de leur positionnement en profondeur de la structure protéique.

Dans un second temps, les approches de glycomique appliquées au profilage et à la caractérisation des N-glycannes - libérés (1) dans le gel d'acrylamide des chaînes peptidiques séparées par SDS-PAGE, et (2) des glycopeptides trypsiques séparés par RP-HPLC - nous ont permis de positionner les N-glycannes sur six des huit sites de N-glycosylation (Fig. 26) :

(1) le résidu d'Asn<sup>133</sup> (peptide a), arbore des structures oligomannosidiques tronquées et à chaîne courte (Fuc<sub>0-1</sub>Man<sub>4-5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>), complexes (Fuc<sub>0-1</sub>Gal<sub>0-1</sub>Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>5</sub>) et hybrides (Fuc<sub>0-1</sub>Gal<sub>0-1</sub>Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>4</sub>) ; (2) le résidu Asn<sup>367</sup> (peptide b) est uniquement occupé par des structures oligomannosidiques (Fuc<sub>0-1</sub>Man<sub>3-5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>) ; (3) Les résidus Asn<sup>692</sup> et Asn<sup>766</sup> (peptide d), sont glycosylés par des structures oligomannosidiques (Fuc<sub>0-1</sub>Gal<sub>0-1</sub>Man<sub>3-7</sub>GlcNAc<sub>2</sub>), hybrides (Fuc<sub>0-1</sub>Gal<sub>0-1</sub>Man<sub>4-5</sub>GlcNAc<sub>4</sub>) et complexes (Fuc<sub>0-1</sub>Gal<sub>0-2</sub>Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>4-5</sub>) ; et (4) les résidus Asn<sup>497</sup> et Asn<sup>930</sup> (peptides c et e) sont respectivement occupés par les N-glycannes de type oligomannosidique Glc<sub>0-1</sub>Man<sub>5-9</sub>GlcNAc<sub>2</sub> (incluant la structure immature monoglucosylée Glc<sub>1</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>) et Fuc<sub>0-1</sub>Man<sub>3-5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>.



Figure 26 : Positionnement des N-glycannes sur six des huit sites de N-glycosylation de la bLAMAN. Symboles : O, Glc ; ■, GlcNAc ; ●, Man ; □, Gal ; ▲, Fuc.

Le site de glycosylation  $Asn^{133}$  est majoritairement occupé par des structures hybrides (Fuc<sub>0-1</sub>Gal<sub>0-1</sub>Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>4</sub>) et complexes (Fuc<sub>0-1</sub>Gal<sub>0-1</sub>Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>5</sub>), les structures oligomannosidiques à chaîne courte et tronquées (Fuc<sub>0-1</sub>Man<sub>4-5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>) constituant les espèces mineures. La présence de structures hybrides et complexes confirme que le site  $Asn^{133}$  est exposé en surface, permettant ainsi l'accessibilité aux glycosidases et aux glycosyltransférases golgiennes, responsables de leur synthèse. Il a en effet été montré que le

site Asn<sup>133</sup> est situé sur un coude joignant deux hélices  $\alpha$ , exposé à la surface, qui jouerait un rôle important dans le repliement de la chaîne protéique (Heikinheimo *et al.*, 2003).

Le site de glycosylation  $Asn^{497}$  (peptide c), rigoureusement conservé des plantes au mammifères, est principalement occupé par les deux N-glycannes immatures  $Glc_{0,1}Man_9GlcNAc_2$  (résultats non encore publiés). Bien que nos résultats confirment leur présence sur le site  $Asn^{497}$ , d'autres structures oligomannosidiques à chaîne courte ont également été détectées. Les structures, portées par le site  $Asn^{497}$ , joueraient un rôle important dans la stabilisation et la compaction de la région protéique proche du site actif de l'enzyme formée par un groupe de trois hélices  $\alpha$ , joignant les chaînes peptidiques b et c, avec lesquelles les glycannes contractent un grand nombre de liaisons hydrogène (Heikinheimo *et al.*, 2003). Cette configuration des glycannes, portés par ce site, est rendue possible grâce à la formation d'une boucle octapeptidique stabilisée par un pont disulfure intrachaîne (Cys<sup>493</sup>-Cys<sup>501</sup>), également rigoureusement conservé. La mutagénèse dirigée contre chacun des résidus de Cys conduit à une disparition des structures immatures Glc<sub>0,1</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub> sur le site **Asn<sup>497</sup>** et à une diminution considérable de la stabilité lysosomale de la rhLAMAN et la bLAMAN (résultats non encore publiés).

Les résidus d'Asn<sup>367</sup> (peptide b) et Asn<sup>930</sup> (peptide e) sont exclusivement glycosylés par des structures oligomannosidiques tronquées (Fuc<sub>0-1</sub>Man<sub>3-4</sub>GlcNAc<sub>2</sub>) et à chaîne courte (Fuc<sub>0-1</sub>Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>). La présence de telles structures, comme c'est le cas de la plupart des enzymes lysosomaux, que nous avons listés plus haut, indiquent qu'elles sont positionnées en surface de l'enzyme et qu'elles ont pu être générées soit par l'action de la bLAMAN, ellemême, sur des structures oligomannosidiques plus large, soit par l'action d'autres exoglycosidases sur des structures nativement hybrides. Par ailleurs, le site Asn<sup>766</sup>, également glycosylé par des structures oligomannosidiques et hybrides, est situé dans une région très riche en résidus basiques (Heikinheimo *et al.*, 2003), conservés pour la plupart d'entre eux, qui formeraient le signal de reconnaissance par la GlcNAc-1-P T (Cuozzo *et al.*, 1998; Metcalf & Fusek, 1993). De plus, il a été montré que les sites Asn<sup>367</sup>, Asn<sup>766</sup> et Asn<sup>930</sup> sont localisés en surface de la bLAMAN et sont séparés d'environ 40 Angströms (Heikinheimo *et al.*, 2003). Ainsi, les N-glycannes de type oligomannosidique portés par les sites Asn<sup>367</sup> et Asn<sup>930</sup> constituent également d'excellentes cibles pour la formation du signal d'adressage au Man-6-P.

# CHAPITRE II :

# APPROCHES DE GLYCOMIQUE POUR LE PROFILAGE ET LA CARACTERISATION DES OLIGOSACCHARIDURIES ET DES SIALURIES

1-INTRODUCTION ET OBJECTIFS DE THESE	109
1.1-Introduction	109
1.2-Objectifs du travail de thèse	110
2-RESULTATS	110
2.1-Profilage spectrométrique des oligosacchariduries et des sialuries	110
2.2-Identification et caractérisation de nouveaux oligosaccharides excrétés dans l'urine d'u	in patient
atteint de β-mannosidose	111
2.2.1-Profilage MALDI-MS des oligosaccharides urinaires perméthylés de β-mannosidose	112
2.2.2-Séquençage et positionnement des points de branchement des oligosaccharides	urinaires
deutéroréduits perméthylés par nano-ESI-MS/MS	115
2.2.3-Détermination de la séquence primaire et de la configuration des carbones anomérique	es par les
dégradations exoglycosidasiques et chimiques séquentielles des oligosaccharides	urinaires
deutéroduits	115
3-DISCUSSION	117

## **1- INTRODUCTION ET OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE**

## **1.1-** Introduction

Les glycoprotéinoses regroupent une dizaine d'anomalies congénitales du catabolisme des glycoprotéines, hors protéoglycannes, causées par des déficiences en glycosidases ou en leurs cofacteurs (Michalski, 1996; Michalski & Klein, 1999; Thomas, 2001). Ces déficits génétiques se transmettent sur le mode autosomal récessif. L'incidence des glycoprotéinoses est comprise entre 1/250000 et 1/1000000 (Reuser *et al.*, 1994). La déficience en l'une des glycosidases a pour conséquence le blocage de la voie catabolique complète et donc l'accumulation de glycannes ou de glycopeptides (glycoasparagines, O-glycosylsérines et O-glycosylthréonines de type mucine) partiellement dégradés au sein du lysosome. Le matériel glucidique, accumulé dans les lysosomes, se retrouve, à terme, éliminé par cytolyse dans les compartiments extracellulaires, puis dans les urines (oligosaccharidurie) et le plasma sanguin des patients. Dans l'urine des patients souffrant de glycoprotéinoses, les structures glucidiques majeures sont généralement des N-glycannes, possédant un ou deux résidus de GlcNAc proximaux, en fonction de l'espèce.

Les sialuries, comprenant la sialurie type français, qui résulte d'une anomalie de rétroinhibition allostérique de la GNE par le CMP-NeuAc, la maladie de Salla et ses formes infantiles sévères, qui, elles, résultent d'une anomalie génétique du transport lysosomal du NeuAc par la sialine, se traduisent toutes par une accumulation intracellulaire en NeuAc. Comme pour les glycoprotéinoses, ces maladies conduisent à une élimination du NeuAc intracellulaire par cytolyse vers les compartiments extracellulaires, puis dans l'urine et le plasma sanguin.

A l'heure actuelle, le dépistage rapide des glycoprotéinoses est réalisé, en routine dans les laboratoires de biochimie analytique, par le profilage des oligosaccharides / glycopeptides urinaires par CCM en gel de silice, suivie de leur révélation par l'orcinol sulfurique (Humbel & Collart, 1975 ; Sewell, 1979 ; Meikle *et al.*, 2004). Le profilage des oligosacchariduries a également été envisagé par HPLC (Kin & Wolfe, 1980 ; Hommes & Varghese, 1991 ; Peelen *et al.*, 1994) et par FACE (Starr *et al.*, 1996). Malgré les nombreux avantages de ces approches (quantification, sensibilité et résolution), elles ne sont, à l'heure actuelle, que très peu utilisées dans les laboratoires de biochimie clinique.

Le dépistage biochimique des sialuries est réalisé en quantifiant le NeuAc libre urinaire, ou issu de cultures de fibroblastes cutanés, par le dosage du chromophore formé par réaction avec l'acide thiobarbiturique (Warren, 1959 ; Skoza & Mohos, 1976 ; Paschke *et al.*, 1992), ou par des approches chromatographiques, telles que l'HPLC (Seppala *et al.*, 1991) ou encore la chromatographie en phase gazeuse couplée à une détection par spectrométrie de masse (GC-MS) (Stankovics *et al.*, 1997).

## 1.2- Objectifs du travail de thèse

Notre travail de thèse s'inscrit dans le cadre de l'institut des maladies rares, et consiste en la mise au point d'approches bioanalytiques globales permettant, en routine, l'exploration du métabolisme normal et pathologique des glycoprotéines, à haut débit. Dans un premier temps, nous décrivons une double méthodologie permettant le dépistage et l'étiquetage rapides (24 heures) et simultanés des sialuries et des oligosacchariduries, par la microanalyse du matériel glucidique (oligosaccharides, glycopeptides et monosaccharides), contenu dans 20  $\mu$ L d'urine non purifiée, de patients. Cette stratégie a été validée sur sept modèles de glycoprotéinoses (sialidose, I-cell disease, maladie de Morquio, maladie de Sandhoff,  $\alpha$ -mannosidose, fucosidose et aspartylglucosaminurie) et un modèle de la maladie de Pompe (Cori, 1958), causée par une déficience en  $\alpha$ -glucosidase, glycosidase impliquée dans le catabolisme lysosomal du glycogène, et qui conduit également à une excrétion urinaire en tétraglucoside (Glc<sub>4</sub>) (Hallgren *et al.*, 1974). Dans un second temps, nous présentons les résultats du profilage des oligosaccharides urinaires d'un patient atteint de  $\beta$ -mannosidose, et de la caractérisation structurale de nouvelles structures diagnostiques, jamais décrites chez l'homme.

## **2- RESULTATS**

### 2.1- Profilage spectrométrique des oligosacchariduries et des sialuries

Ces travaux font l'objet d'un article soumis à *Proteomics* :

Faid V, Michalski JC, Morelle W. A mass spectrometric strategy for profiling glycoproteinosis, Pompe disease and sialic acid storage diseases. Proteomics. 2007.



#### A MASS SPECTROMETRIC STRATEGY FOR PROFILING GLYCOPROTEINOSES, POMPE DISEASE AND SIALIC ACID STORAGE DISEASES

Journal:	Clinical Applications		
Manuscript ID:	PRCA-2007-00097.R1		
Wiley - Manuscript type:	Research Article		
Date Submitted by the Author:	n/a		
Complete List of Authors:	Faid, Valegh; Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, Biochemistry Michalski, Jean-Claude; Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, Biochemistry MORELLE, Willy; Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, Biochemistry		
Keywords:	Glycomics, Mass spectrometry		



# A MASS SPECTROMETRIC STRATEGY FOR PROFILING GLYCOPROTEINOSES, POMPE DISEASE AND SIALIC ACID STORAGE DISEASES

Valegh FAID, Jean-Claude MICHALSKI and Willy MORELLE\*

Unité Mixte de Recherche CNRS/USTL 8576, « Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle », IFR 147, Bâtiment C9, Université des Sciences et Technologies de Lille 1, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

Key words: mass spectrometry; structural analysis; lysosomal storage diseases; Oligosacchariduria; Pompe disease; glycoproteinoses; I-cell disease; Sialic acid storage diseases.

\* To whom correspondence should be addressed: Tel: +33 3 20 43 41 46 Fax: +33 3 20 43 65 55

E-mail: <u>willy.morelle@univ-lille1.fr</u>

Section: Glycoproteomics

Running title: Mass profiling of oligosacchariduria

Non standard abbreviation: Fuc, Fucose; GlcNAc, *N*-acetylglucosamine; HexNAc, *N*-acetylhexosamine; Hex, hexose; Gal, galactose; Glc, glucose; Man, mannose; NeuAc, *N*-acetylneuraminic acid; GAG, glycosaminoglycans; GC-MS, gas chromatography-mass spectrometry; MALDI-TOF-MS, matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry.

# ABSTRACT

Glycoproteinoses, Pompe disease and sialic acid storage diseases are characterized by a massive accumulation of unprocessed oligosaccharides and/or glycoconjugates in urine. The identification of these glycocompounds is essential for a proper diagnosis. In this study, we investigated the potential of MALDI-TOF mass spectrometry to identify glycocompounds present in urine from patients with different inborn errors of glycan metabolism. Urinary glycocompounds were permethylated, and analyzed using gas chromatography-mass spectrometry and MALDI-TOF mass spectrometry. In order to confirm tentative assignments, a second aliquot of urine was purified on a C18 Sep-Pak cartridge and glycocompounds were desalted on a column of non-porous graphitized carbon. The glycocompounds were then sequentially on-plate digested using an array of exoglycosidases. A range of disease-specific oligosaccharides as well as glycopeptides was identified for all oligosacchariduria models. In addition, free sialic acid accumulated in urine from a patient suffering from French-type sialuria, has been detected by a GC-MS approach, which could be applied to other sialic acid storage diseases. This procedure is simple, and can be performed in few simple steps in less than 24 hours. This current method can be applied for newborn screening for other inherited metabolic diseases as well as for assessing treatments in clinical trials.



## INTRODUCTION

Lysosomal storage disorders (LSD) are a large group of metabolic diseases, inherited in an autosomal recessive manner and result from a defective enzyme activity. The enzyme deficiency can be due to (i) absence of protein, (ii) production of inactive protein, (iii) defects of activator or protective protein, (iv) defects of transport through the lysosomal membrane or (v) abnormal intracellular localization of protein. These genetic defects are characterized by the accumulation of unprocessed catabolic products within lysosomes, leading to an increase of their size as cell body. Lysosomal storage metabolites include glycosaminoglycans (GAG), oligosaccharides, glycopeptides, sphingomyelins, glycolipids, and cholesterol. In LSD, the increased lysosomal storage in tissues leads to elevated catabolic product levels in plasma and urine, from which some biomarkers can be provided for diagnostic of these genetic defects [1].

Glycoproteinoses, glycogen storage disease type II (GSD-II, Pompe disease) and sialic acid storage diseases (SASD) form an important group of LSD. These disorders commonly result in a deficiency of a lysosomal exoglycosidase, which stepwise degrades the terminal non-reducing monosaccharide residue of the oligosaccharides and glycoconjugates, a cofactor, or a carrier of the lysosomal membrane which delivers catabolic products to the cytoplasm. These genetic defects lead to a massive accumulation of unprocessed oligosaccharides and/or glycoconjugates in urine, due to cytolysis of sick cells from most of tissues of patients.

In urine of patients suffering from glycoproteinoses, the accumulating oligosaccharides are *N*glycans, with one GlcNAc residue at the reducing end. In addition, in several glycoproteinoses, a complex mix of partially undigested glycoconjugates (glycolipids/glycopeptides) can also be urinary excreted with *N*-glycans since the catabolism of their carbohydrate moiety involves the same set of lysosomal enzymes. Patients suffering from glycoproteinoses, including  $\alpha$ -sialidosis (Mucolipidosis I), galactosialidosis, Morquio type B disease, Sandhoff disease,  $\alpha$ - and  $\beta$ mannosidosis,  $\alpha$ -fucosidosis, aspartylglucosaminuria, I-cell disease (ICD, Mucolipidosis II and III), and  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase deficiency (Schindler / Kanzaki diseases), are characterized by varying clinics presentations including mental retardation, skeletal changes and organomegaly [2, 3]. Among these glycoproteinoses, ICD constitutes a unique status in which the defect is due to a deficiency in the formation of the mannose-6-phosphate signal responsible for the lysosomal targeting of hydrolases [4, 5].

GSD are genetic defects in one of the enzymes involved in the metabolism of glycogen and GSD type II (Pompe disease), due to an acidic  $\alpha$ -glucosidase deficiency, is the only one referred to as LSD [6]. This genetic defect is characterized by an accumulation of partially degraded

glycogen within lysosomes and affects essentially cells of nervous system, heart and skeletal muscles. Pompe disease is associated with an elevated urinary excretion of a glucose tetraoligosaccharide (Glc<sub>4</sub>) [7].

Inborn errors of SASD are related to three genetic defects: infantile free sialic acid storage disease (ISSD) [8,9], Salla disease [10] and French-type sialuria [11], which commonly lead to a urinary excretion of free sialic acid [12]. ISSD and Salla disease result in a failure in the transport mechanism of free sialic acid through the lysosomal membrane towards the cytoplasm, while French-type sialuria results in a defective feed-back inhibition of biosynthesis of sialic acid. These diseases differ in the amount of sialic acid urinary excreted. The diagnosis of SASD is based on clinical presentations in combination with detection of free sialic acid urinary excreted in an important amount [13]. The quantification of free sialic acid in tissues and urine of patients can be classically performed using thiobarbituric acid (TBA)-based assays [14,15]. The GC-MS can also be used to identify and quantify free sialic acid in urine, as its carboxymethylated peracetylated derivative, for the diagnosis of SASD [16].

The diagnosis of glycoproteinoses, recently reviewed by Meikle *et al.* [17], is classically performed by analyzing urinary oligosaccharides and/or other glycoconjugates by thin-layer chromatography (TLC) on silica gel plates. Although this method is effective, the glucidic material revealed onto the silica gel plates can not be directly identified and has to be purified in important quantity for further structural characterization using chemical, enzymatic and spectrometric approaches (nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR) approaches. Several methods, based on high performance liquid chromatography (HPLC) [18-20] or fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis (FACE) [21], have also been reported to quantify and identify the accumulated metabolic products in urine of patients suffering from glycoproteinoses and GSD-II. Although their usefulness and sensitivity, both analytical approaches have not been widely applied routinely for screening of these defects in the analytical laboratories, because they are time-consuming and can not be used as high throughput platforms.

Therefore, glycoconjugates storage diseases require sensitive and rapid analytical tools able to identify the accumulating glycoconjugates in urine. Over the last decades, mass spectrometry (MS) has gained a prominent position among analytical methods dedicated newborn screening for inborn errors of metabolism [22,23]. MS analysis is able to characterize many biomolecules from complex biological fluids such as urine or plasma with high accuracy and resolution, using a few sample amounts. Recently, electrospray ionization-mass spectrometric approaches were proposed for studying glycoproteinoses and GSD-II, using or not fluorescent labelling, and

some of them were reported to allow quantification of reducing glycobiomarkers [24-27]. Moreover, matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) is also very useful for screening for metabolic diseases, discovery of disease-associated biomarkers or monitoring of therapies. MALDI-TOF-MS instruments are semi-automated, rapid, robust, cost effective and can be used as high throughput platforms for newborn screening for inherited metabolic diseases. Using this instrument, Klein et al. [28], have proposed a method for characterizing urinary oligosaccharides of patients suffering from different oligosaccharidurias, as their 8-aminonaphthalene-1,3,6-trisulfonic acid-(ANTS)-derivatives. This derivatization increases the sensitivity of detection in mass spectrometry experiments, and allows the analysis of reducing oligosaccharides. However, this method cannot be used to detect glycoconjugates, as for example glycoaminoacids accumulated during fucosidosis or Schindler/Kanzaki diseases. Moreover, considerable in-source and post-source fragmentation by metastable loss of sialic acid and/or sulphate groups of oligosaccharides/glycopeptides has known to occur in MALDI-TOF-MS. In these conditions, the analysis of sialylated/sulphated oligosaccharides becomes difficult without chemical stabilization procedure of these groups. Permethylation of oligosaccharides [29] has been shown to allow the analysis of sialylated glycans by MALDI-TOF-MS with high sensitivity and accuracy measurement.

In the current study, we describe a MS approach for screening patients for glycoproteinoses, GSD-II, and SASDs. Urinary glycoconjugates are permethylated and analysed using GC-MS and MALDI-TOF-MS. First, the GC-MS analysis allows to detect free sialic acid which accumulates in urine of patients suffering from SASD. Secondly, the MALDI-TOF-MS analysis allows to identify the specific disease oligosaccharides or glycopeptides. This approach was applied to the characterization of glycoconjugates present in urine of patients suffering from sialidosis, Morquio type B disease, Sandhoff disease,  $\alpha$ -mannosidosis,  $\alpha$ -fucosidosis, aspartylglucosaminuria, I-cell disease and Pompe disease (GSD II).

## MATERIALS AND METHODS

### MATERIALS AND URINE SAMPLES

Urine from healthy control subjects and patients suffering from sialidosis, Morquio type B disease, Sandhoff disease,  $\alpha$ -mannosidosis,  $\alpha$ -fucosidosis, aspartylglucosaminuria, I-cell disease and Pompe disease (GSD II) were frozen at - 20 °C until used.  $\alpha$ -sialidase from *Arthrobacter ureafaciens* (EC 3.2.1.18) was purchased from Roche Molecular Biochemicals (Indianapolis, IN, USA). Bovine testis  $\beta$ -galactosidase (EC 3.2.1.23), *Jack bean*  $\alpha$ -mannosidase, *Jack bean N*-acetyl- $\beta$ -hexosaminidase (EC 3.2.1.30) and bovine kidney  $\alpha$ -fucosidase (EC 3.2.1.51) were

purchased from Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA). Dimethylsulfoxide (DMSO) and iodomethane were from Fluka (Buchs, Switzerland). 2.5-dihydroxybenzoïc acid (DHB) was purchased from Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA). Methanol, acetonitrile, and trifluoroacetic acid (TFA) were HPLC reagent grade. All aqueous solutions were prepared using ultra-pure water.

#### PERMETHYLATION OF THE GLYCOCOMPOUNDS

After lyophilisation, 20  $\mu$ L of urine were subjected to permethylation according to the procedure developed by Ciucanu and Kerek [29]. The reaction was terminated by adding 1 mL of 25% (v/v) cold acetic acid followed by three extractions with 800  $\mu$ L of chloroform. The pooled chloroform phases were washed eight times with one volume of ultra-pure water, and dried under a stream of nitrogen.

### GC-MS ANALYSIS OF THE METHYLATED DERIVATIVES

After chloroform/water partitioning, a 0.2% (v/v)-aliquot of the methylated derivatives was analysed by GC-MS. GC separation was performed using a Carbo Erba GC 8000 gas chromatograph fitted with a 25 m x 0.32 mm CP-Sil5 CB Low bleed capillary column, 0.25 µm film phase (Chrompack France, Les Ullis, France). The temperature of the Ross injector was 260 °C. Samples were analyzed using a temperature programm starting by a gradient of 2°C/min from 130°C to 180°C, after 2 min at 130°C, followed by a gradient of 4°C/min until 240°C. The column was coupled to a Finnigan Automass II mass spectrometer. Analyses were performed in the electron impact mode using an ionization energy of 70 eV. Quantification of the methylated derivatives was carried out using total ion current (TIC) of the MS detector in positive ion mode.

#### PURIFICATION OF THE METHYLATED DERIVATIVES

Before MALDI-TOF-MS analysis, the methylated derivatives were purified using a C18 Sep-Pak cartridge (Waters, Milford, MA, USA). The C18 Sep-Pak was sequentially conditioned with methanol (5 mL) and water (2 x 5 mL). The derivatized glycocompounds, dissolved in methanol, were loaded onto the C18 cartridge, washed with 2 x 5 mL water, 2 mL of 10% (v/v) acetonitrile in water and eluted with 3 mL of 80% (v/v) acetonitrile in water. Acetonitrile was evaporated under a stream of nitrogen and the samples were freeze-dried.

#### PURIFICATION OF THE FREE GLYCOCOMPOUNDS FROM URINE

Before performing on-target sequential exoglycosidase digestions, peptides, proteins and colorants were removed using a C18 Sep-Pak cartridge (Waters, Milford, MA, USA). After conditioning the C18 Sep-Pak by sequential washing with methanol (5 mL) and 5 % (v/v)

acetonitrile / 0.1 % (v/v) TFA (2x 5 mL), 50  $\mu$ L of urine was loaded onto the C18 Sep-Pak. Oligosaccharides and glycoaminoacids were recovered using 3 mL of 5 % (v/v) acetonitrile / 0.1 % (v/v) TFA and then freeze-dried. The urinary glycocompounds were then desalted onto a column of 150 mg of non-porous graphitized carbon (Alltech, Deerfield, IL, USA). The column was sequentially washed with 5 mL methanol and 2 x 5 mL 0.1% (v/v) TFA. The glycocompounds were dissolved in 1 mL of 0.1% (v/v) TFA, applied to the column and washed with 3 x 5 mL of 0.1% (v/v) TFA. The elution of glycocompounds was conducted with the application of 3 mL of 25% (v/v) acetonitrile in water containing 0.1% (v/v) TFA. The fractions were freeze-dried.

# MATRIX-ASSISTED LASER DESORPTION/IONIZATION-TIME OF FLIGHT-MASS SPECTROMETRY (MALDI-TOF-MS)

MALDI-TOF-MS experiments were carried out on a Voyager Elite DE-STR Pro instrument (PersSeptive Biosystem, Framingham, MA, USA) equipped with a pulsed nitrogen laser (337 nm) and a gridless delayed extraction ion source. The spectrometer was operated in positive reflectron mode by delayed extraction with an accelerating voltage of 20 kV and a pulse delay time of 550 nsec and a grid voltage of 72%. All spectra shown represent accumulated spectra obtained by 500 laser shots. Samples were prepared by mixing 1  $\mu$ L (5 to 10 picomoles) with 1  $\mu$ L of matrix solution, on the MALDI sample plate. The matrix solution was prepared by dissolving DHB at the final concentration of 10 mg/mL of methanol-water (1: 1).

The on-target sequential exoglycosidase digestions were performed on desalted glycocompounds, dissolved with ultra-pure water at 20 picomoles/ $\mu$ L. 1  $\mu$ L of the sample was spotted on the MALDI sample plate and 1  $\mu$ L of 50 mM ammonium formiate (pH 4.6) was added. For enzymatic sequencing, several enzyme arrays, used in combination or not, were added on each spotted sample according to the following procedure:  $\alpha$ -sialidase, 50 mU ;  $\beta$ -galactosidase, 1.25 mU ; *N*-acetyl- $\beta$ -hexosaminidase, 150 mU ;  $\alpha$ -fucosidase, 7.7 mU;  $\alpha$ -mannosidase, 35 mU. The MALDI plate was then placed in a crystallization beaker containing water, at 37°C for 6 hours. After drying, 2  $\mu$ L of a matrix solution (DHB) were added.

# RESULTS

### STRATEGY

The strategy employed for the detection of free urinary sialic acid as well as mass mapping of free urinary glycocompounds (oligosaccharides and glycopeptides) is outlined in Scheme 1. In a first step, free urinary glycocompounds of 20  $\mu$ L of urine are permethylated. After stopping the reaction, the methylated derivatives are purified by performing a chloroform/water partitioning

followed by several washes of the chloroform phase with ultra-pure water. An aliquot (0.2 % (v/v)) of the chloroform phase is then used for GC-MS detection of free sialic acid while the remaining aliquot is dried under a stream of nitrogen and purified onto a C18 Sep-Pak cartridge for MALDI-TOF-MS analysis. Samples, which display abnormal MALDI mass profiles, are then subjected to additional experiments in order to confirm tentative assignments. For this purpose, a second aliquot of urine (50  $\mu$ L) is purified on a C18 Sep-Pak cartridge to remove proteins, peptides, colorants or other hydrophobic contaminants and glycocompounds are desalted on a column of non-porous graphitized carbon. The glycocompounds are then sequentially on-plate digested using an array of exoglycosidases.

# GC-MS DETERMINATION OF THE URINARY EXCRETION RATE OF FREE SIALIC ACID

After permethylation of 20  $\mu$ L of urine, an aliquot (0.2% (v/v)) of the purified chloroform phase is analyzed using a GC-MS instrument. This first analysis allows rapidly detecting abnormalities in the urinary excretion of sialic acid, as it is observed in patients suffering from SASD. The total ion current (TIC) of the permethylated low molecular weight compounds (mono- to trisaccharides, sialic acid, aminoacids, and toxics), present in urine of 20 healthy subjects did not give rise to the presence of a significant amount of sialic acid. However, as expected, the TIC of the permethylated glycocompounds from urine of a patient suffering from French-type sialuria, exemplified in Figure 1A, showed the presence of a great amount of sialic acid, detected as its two anomer forms. The identification of both anomeric forms of NeuAc was unambiguously confirmed by the interpretation of the EI-mass spectrum, depicted in Figure 1B. In addition, using NeuAc as an external standard, the concentration of total free sialic acid has been determined to be about 8 mg/mL of urine, while the concentration of total free sialic acid in a healthy subject is about 5000-fold less elevated.

# MALDI-TOF MASS PROFILING OF FREE OLIGOSACCHARIDES AND GLYCOPEPTIDES OF URINE FROM HEALTHY PERSONS *VS* PATIENTS SUFFERING FROM OLIGOSACCHARIDURIAS

*Non-pathological urines*. Figure 2 depicts the MALDI-TOF mass profiles of the permethylated oligosaccharides from a blood group A secretor female (Figures 2A, 2B) and a non-secretor blood group A male (Figures 2C, 2D). Urine is known to contain numerous oligosaccharides, with Glc or lactose Gal( $\beta$ 1,4)Glc as the reducing core and their excretion levels depend on various factors such as age, pregnancy or diet as well as the ABH/secretor profile and the Lewis blood group of each individual [30]. Although inter- and intra-individual variability in excretion

of urinary oligosaccharides is known to occur, the same major molecular ions were found in the healthy subjects who possess the same blood group and Lewis status. As depicted in Figures 2A and 2B, a very heterogeneous mixture of oligosaccharides was observed, affording about fifty pseudomolecular ions [M+Na]<sup>+</sup>. The MALDI-TOF spectrum was dominated by a strong signal at m/z 477 (Hex<sub>2</sub>), which corresponds in majority to lactose, accompanied by its sialylated form at m/z 838 (NeuAc<sub>1</sub>Hex<sub>2</sub>). The signal at m/z 879 (NeuAc<sub>1</sub>HexNAc<sub>1</sub>Hex<sub>1</sub>) corresponds in majority to sialyllactosamine [31]. Signals at m/z 692 (HexNAc<sub>1</sub>Hex<sub>1</sub>dHex<sub>1</sub>) and m/z 1071 (HexNAc<sub>1</sub>Hex<sub>2</sub>dHex<sub>2</sub>) may correspond to a trisaccharide GalNAc( $\alpha$ 1,3)[Fuc( $\alpha$ 1,2)]Gal and a pentasacharide GalNAc( $\alpha$ 1,3)[Fuc( $\alpha$ 1,2)]Gal[Fuc( $\alpha$ 1,3)]( $\beta$ 1,4)Glc, as a consequence of Le b/A blood group status for this secretor individual [32]. Concerning the A blood group non-secretor subject (Figures 2C, 2D), the same major ions were observed except for the ion at m/z 1071 (HexNAc<sub>1</sub>Hex<sub>2</sub>dHex<sub>2</sub>). The signal at m/z 1241 (NeuAc<sub>2</sub>HexNAc<sub>1</sub>Hex<sub>1</sub>) may correspond in majority to the "mucin-like" oligosaccharide NeuAc( $\alpha 2,3$ )[NeuAc( $\alpha 2,6$ )]Gal( $\beta 1,3$ )GalNAc, described by Parkkinen and Finne [33]. Oligosaccharides with only hexose residues were observed at m/z 681 (Hex<sub>3</sub>), 885 (Hex<sub>4</sub>), 1090 (Hex<sub>5</sub>), 1498 (Hex<sub>7</sub>), 1702 (Hex<sub>8</sub>), 1906 (Hex<sub>9</sub>), 2112 (Hex<sub>10</sub>) and 2316 (Hex<sub>11</sub>). Minor *N*-glycan structures were also detected in both controls with a major pseudomolecular ion at m/z 2794 (NeuAc<sub>2</sub>HexNAc<sub>4</sub>Hex<sub>5</sub>). The chemical compositions in terms of Hex, dHex, HexNAc, and sialic acids of the other ions are summarized in Table 1.

Sialidosis. Sialidosis is a glycoproteinosis associated to sialidase deficiency [34], which leads to a massive accumulation of a great variety of ( $\alpha 2,3$ )- and/or ( $\alpha 2,6$ )-sialylated *N*-glycans in tissues and urine of patients [35-38]. Figure 3A shows the MALDI-TOF spectrum of the permethylated oligosaccharides which is dominated by a strong signal at *m/z* 2549 (NeuAc<sub>2</sub>HexNAc<sub>3</sub>Hex<sub>5</sub>), having composition consistent with a bisialylated biantennary structure. Other sialylated *N*glycans, with one GlcNAc residue at the reducing end, were also observed and correspond to bi-, tri-, and tetraantennary structures. The structures of these glycans are shown in figure 3A. The ions at *m/z* 1533 (NeuAc<sub>1</sub>HexNAc<sub>2</sub>Hex<sub>3</sub>), and 2344 (NeuAc<sub>2</sub> HexNAc<sub>3</sub>Hex<sub>4</sub>) have composition consistent with fully sialylated mono- and biantennary structures, truncated of the ( $\alpha 1$ -6)-linked Man residue. Minor structures consistent with tetraantennary structures with one (*m/z* 4259, NeuAc<sub>3</sub>HexNAc<sub>6</sub>Hex<sub>8</sub>) or two (*m/z* 4345, NeuAc<sub>2</sub>HexNAc<sub>7</sub>Hex<sub>9</sub>) additional Nacetyllactosaminyl units were also observed.

*I-Cell Disease*. I-Cell Disease is a rare inherited catabolic disorder caused by a mutation in the GNPTA gene that leads to a deficiency in the enzyme UDP-N-acetylglucosamine-1-

phosphotransferase, responsible for the formation of the mannose-6-phosphate signal, required for the lysosomal targeting of lysosomal hydrolases [4, 5]. This genetic defect is characterized by the abnormal presence of "dense-bodies" in cytoplasm of cultured fibroblasts and is associated with a massive accumulation of sulphated mucopolysaccharides, glycolipids and oligosaccharides. Sialylated oligosaccharides, like those found in the urine of patients suffering from sialidosis, were also observed in urine of patients suffering from I-cell disease. Indeed, the MALDI-TOF spectrum of the permethylated oligosaccharides, depicted in figure 3B, is characterized by a great variety of pseudomolecular ions which are similar with those observed in urine of patients suffering from sialidosis. It has been shown that sialylated *N*-glycans accumulated in I-Cell Disease urine were 10 to 50 times lower as compared to sialidosis [35]. This last observation is confirmed by the difference between the relative intensity of the diagnostic peaks from both spectra (Figures 3A and 3B).

*Morquio type B disease*. Morquio type B disease is characterized by a  $\beta$ -galactosidase deficiency which leads to an accumulation of keratan sulphate and  $\beta$ -galactose-terminated oligosaccharides originating from *N*- and *O*-glycosylproteins [39,40]. As shown in Figure 3C, the MALDI-TOF spectrum of the permethylated oligosaccharides of a patient suffering from Morquio type B disease is dominated by two ions at *m*/*z* 1171 (HexNAc<sub>2</sub>Hex<sub>3</sub>) and 1826 (HexNAc<sub>3</sub>Hex<sub>5</sub>) and correspond, respectively, to a linear monoantennary *N*-glycan and a biantennary *N*-glycan, both carrying one GlcNAc residue at the reducing end. The ions at *m*/*z* 651 (Hex<sub>2</sub>dHex<sub>1</sub>) and m/z 1029 (Hex<sub>3</sub>dHex<sub>2</sub>), correspond respectively to a trisaccharide Gal( $\alpha$ 1,3)[Fuc( $\alpha$ 1,2)]Gal and a pentasacharide Gal

 $(\alpha 1,3)$ [Fuc $(\alpha 1,2)$ ]Gal[Fuc $(\alpha 1,3)$ ] $(\beta 1,4)$ Glc as a consequence of the Le b/B blood group status for this secretor individual. The ion at m/z 1376 (Hex<sub>4</sub>HexNAc<sub>2</sub>) has a monosaccharidic composition consistent with a monoantennary structure and may also correspond to the atypical galactose- $(\beta 1,6)$ -terminated *N*-glycan described by Michalski *et al.* [41]. *N*-glycans with tri- $(m/z \ 2071, \text{HexNAc}_4\text{Hex}_5; m/z \ 2275, \text{HexNAc}_4\text{Hex}_6)$  and tetraantennary structures (2521, HexNAc<sub>5</sub>Hex<sub>6</sub>; 2725, HexNAc<sub>5</sub>Hex<sub>7</sub>) were also observed.

Sandhoff disease. Sandhoff disease is an inherited glycoproteinosis caused by a mutation of the  $\beta$ -subunit of  $\beta$ -hexosaminidases [42]. This genetic deficiency leads to an accumulation of  $\beta$ -hexosaminide structures originating from *N*-glycosylproteins [43-45]. The MALDI-TOF spectrum of the permethylated glycocompounds accumulated in urine of a patient suffering from Sandhoff disease (Figure 3D) is dominated by two signals at *m*/*z* 1417 and 1662. The ion at *m*/*z* 1417 (HexNAc<sub>3</sub>Hex<sub>3</sub>) has composition consistent with an agalactosylated biantennary structure. The ion at *m*/*z* 1662 (HexNAc<sub>4</sub>Hex<sub>3</sub>) can correspond to a triantennary and/or a biantennary 10

Wiley-VCH

structure with a bisecting GlcNAc residue. Minor agalactosylated tetraantennary structures are also observed at m/z 1907 (HexNAc<sub>5</sub>Hex<sub>3</sub>) and 2152 (HexNAc<sub>6</sub>Hex<sub>3</sub>).

α-mannosidosis. α-mannosidosis [46] is an inherited disorder characterized by a deficiency of the lysosomal α-mannosidase [47]. This genetic defect is responsible for a massive accumulation of unprocessed mannose-containing oligosaccharides originating from *N*glycosylproteins [48-50]. As depicted in Figure 4A, the MALDI-TOF spectrum of the permethylated oligosaccharides accumulated in urine of a patient suffering from α-mannosidosis is characterized by several major ions at m/z 722 (HexNAc<sub>1</sub>Hex<sub>2</sub>), 926 (HexNAc<sub>1</sub>Hex<sub>3</sub>), 1131 (HexNAc<sub>1</sub>Hex<sub>4</sub>), 1335 (HexNAc<sub>1</sub>Hex<sub>5</sub>), 1540 (HexNAc<sub>1</sub>Hex<sub>6</sub>), 1744 (HexNAc<sub>1</sub>Hex<sub>7</sub>), 1948 (HexNAc<sub>1</sub>Hex<sub>8</sub>) and 2152 (HexNAc<sub>1</sub>Hex<sub>9</sub>) corresponding to unprocessed high mannose *N*glycans with one GlcNAc residue at the reducing end.

*GSD-II.* GSD-II is an inherited disorder of glycogen metabolism due to a defect to a lysosomal  $\alpha$ -glucosidase. This disorder is characterized by the presence in urine of a significant amount of Glc<sub>4</sub> [7] and, other minor polyglucosides with various degrees of polymerisation. The MALDI-TOF spectrum of permethylated urinary glycocompounds of a patient suffering from Pompe disease (Figure 4B) is dominated by a strong signal at *m*/*z* 885 (Hex<sub>4</sub>), corresponding to Glc<sub>4</sub>, which is a GSD-II specific marker. Other glycans with hexose residues are also observed (Hex<sub>5-18</sub>).

Aspartylglucosaminuria. Aspartylglucosaminuria [51,52] is a glycoproteinosis due to a defect in 1-aspartamido- $\beta$ -N-acetylglucosamine-amidohydrolase that cleaves the linkage between the asparagine residues of the polypeptide backbone and the innermost GlcNAc residue of the Nlinked oligosaccharide, during the degradation of N-glycosylproteins. As exemplified in Figure 4C, the MALDI-TOF spectrum of the permethylated glycocompounds accumulated in urine of a patient suffering from aspartylglucosaminuria is dominated by the ion at m/z 692 (HexNAc<sub>1</sub>Hex<sub>1</sub>dHex<sub>1</sub>). Several ions which correspond to glycoasparagines with several Nacetyllactosaminyl units were also observed at m/z 629 (Hex1HexNAc1Asn), 990 (NeuAc1 Hex<sub>1</sub>HexNAc<sub>1</sub>Asn), 1079 (Hex<sub>2</sub>HexNAc<sub>2</sub>Asn), 1352 (NeuAc<sub>2</sub>Hex<sub>1</sub>HexNAc<sub>1</sub>Asn), 1440 (NeuAc<sub>1</sub>Hex<sub>2</sub>HexNAc<sub>2</sub>Asn), 1528 (Hex<sub>3</sub>HexNAc<sub>3</sub>Asn), 1890 (NeuAc<sub>1</sub>Hex<sub>3</sub>HexNAc<sub>3</sub>Asn), 1979 2252 (Hex<sub>4</sub>HexNAc<sub>4</sub>Asn), (NeuAc<sub>2</sub>Hex<sub>3</sub>HexNAc<sub>3</sub>Asn) and 2340 (NeuAc<sub>1</sub>Hex<sub>4</sub>HexNAc<sub>4</sub>Asn). The m/z values of these ions indicated that the amino group in asparagine underwent  $\beta$ -elimination during the permethylation. This modification leads to an increase of 111 Da in mass of the permethylated glycosylasparagines compared to the corresponding free oligosaccharides [53]. All these glycosylasparagine structures were

previously structurally elucidated [54-57]. It must be noted that the glycoasparagine structure GlcNAc-Asn [58] was not detected, probably because of the high volatility of the methylated derivative.

*Fucosidosis*. Fucosidosis [59,60] is caused by a deficiency of the lysosomal  $\alpha$ -L-fucosidase (*61*) and associated with a high degree of urinary excretion of fucosylated oligosaccharides and glycoasparagines [62-64]. Data from MALDI-TOF-MS analyses of permethylated glycocompounds accumulated in urine of a patient suffering from fucosidosis are shown in Figure 4D. A heterogeneous mixture of fucosylated oligosaccharides and glycoasparagines was observed. The spectrum was dominated by two molecular ions at m/z 477 (Hex<sub>2</sub>) and 599 (HexNAc<sub>1</sub>dHex<sub>1</sub>Asn). The glycopeptide with the following composition HexNAc<sub>1</sub>dHex<sub>1</sub>Asn corresponds to the major fucosyl-glycoasparagine previously described in fucosidosis urine [63]. Moreover, the signals observed at m/z 1053 (NeuAc<sub>1</sub>HexNAc<sub>1</sub>Hex<sub>1</sub>dHex<sub>1</sub>) and m/z 1258 (NeuAc<sub>1</sub>HexNAc<sub>1</sub>Hex<sub>2</sub>dHex<sub>1</sub>) correspond to sialylated fucosylated oligosaccharides that have never been observed in urine of healthy subjects. The major expected fucosylated oligosaccharides were present at m/z 488 (HexNAc<sub>1</sub>dHex<sub>1</sub>), 1345 (HexNAc<sub>2</sub>Hex<sub>3</sub>dHex<sub>1</sub>) and 1549 (HexNAc<sub>2</sub>Hex<sub>4</sub>dHex<sub>1</sub>).

Several fucosylated oligosaccharides, never described, were also observed at m/z 1345  $(\text{HexNAc}_2\text{Hex}_3\text{dHex}_1)$ , 1549  $(\text{HexNAc}_2\text{Hex}_4\text{dHex}_1)$ , 1794  $(\text{HexNAc}_3\text{Hex}_4\text{dHex}_1)$ , 1969 (HexNAc<sub>3</sub>Hex<sub>4</sub>dHex<sub>2</sub>), 2173 (HexNAc<sub>3</sub>Hex<sub>5</sub>dHex<sub>2</sub>), 2245 (HexNAc<sub>4</sub>Hex<sub>5</sub>dHex<sub>1</sub>) and 2418 (HexNAc<sub>4</sub>Hex<sub>5</sub>dHex<sub>2</sub>). Numerous glycoasparagines previously described in fucosidosis urine observed, as their alkali-modified derivatives, at m/z(62-64) were also 1252 (HexNAc<sub>2</sub>Hex<sub>2</sub>dHex<sub>1</sub>Asn), 1701 (HexNAc<sub>3</sub>Hex<sub>3</sub>dHex<sub>1</sub>Asn), 1875 (HexNAc<sub>3</sub>Hex<sub>3</sub>dHex<sub>2</sub>Asn), 1905 (HexNAc<sub>3</sub>Hex<sub>4</sub>dHex<sub>1</sub>Asn), 2050 (HexNAc<sub>3</sub>Hex<sub>3</sub>dHex<sub>3</sub>Asn), 2080 (HexNAc<sub>3</sub>Hex<sub>4</sub>dHex<sub>2</sub>Asn), 2325 (HexNAc<sub>4</sub>Hex<sub>4</sub>dHex<sub>2</sub>Asn), 2499 (HexNAc<sub>4</sub>Hex<sub>4</sub>dHex<sub>3</sub>Asn), and 2703 (HexNAc<sub>4</sub>Hex<sub>5</sub>dHex<sub>3</sub>Asn). Other glycoasparagines which have never been described were detected at m/z 2948 (HexNAc5Hex5dHex3Asn), 3153 (HexNAc5Hex6dHex3Asn), 3327  $(\text{HexNAc}_{5}\text{Hex}_{6}\text{dHex}_{4}\text{Asn}),$ 3572 (HexNAc<sub>6</sub>Hex<sub>6</sub>dHex<sub>4</sub>Asn) and 3951 (HexNAc<sub>6</sub>Hex<sub>7</sub>dHex<sub>5</sub>Asn). It must be noted that the structural assignments of glycoasparagines were made based on the MALDI mass only and previous studies [62-64]. For clarity, the structures shown in Figure 4D correspond to one isomer but other structures with the same monosaccharidic composition have been described [62-64].

# ON-TARGET EXOGLYCOSIDASE DIGESTIONS OF FREE URINARY GLYCOCOMPOUNDS FROM PATIENTS SUFFERING FROM GLYCOPROTEINOSIS.

To confirm the primary sequence of the diagnostic structures found in urine from diseased subjects, the glycocompounds were submitted to sequential exoglycosidase digestions. For this purpose, 50  $\mu$ L of urine was purified on a Sep Pack C18 cartridge to remove hydrophobic components. Oligosaccharides and glycoaminoacids were then desalted using a non-porous graphitized carbon solid phase extraction cartridge (SPE) and sequentially on-plate digested using an array of exoglycosidases. Three applications are presented.

Sialidosis. After neuraminidase treatment, the MALDI mass spectrum, depicted in Figure 5A, indicated that as expected, all sialylated glycocompounds accumulated in urine of a patient suffering from sialidosis were efficiently digested. The MALDI mass spectrum is characterized by a major signal at m/z 1460 (HexNAc<sub>3</sub>Hex<sub>5</sub>). After  $\beta$ -galactosidase treatment (Figure 5B), all the structures observed in Figure 4A were efficiently digested and five major products were observed at m/z 771 (HexNAc<sub>2</sub>Hex<sub>2</sub>), 933 (HexNAc<sub>2</sub>Hex<sub>3</sub>), 974 (HexNAc<sub>3</sub>Hex<sub>2</sub>), 1136 (HexNAc<sub>3</sub>Hex<sub>3</sub>), and 1339 (HexNAc<sub>4</sub>Hex<sub>3</sub>). Finally, the treatment with *N*-acetyl- $\beta$ -hexosaminidase treatment (Figure 5C), gave rise to a complete digestion of the  $\beta$ -GlcNAc-terminated structures and the resulting MALDI mass spectrum was characterized by two major pseudomolecular ions observed at m/z 568 (HexNAc<sub>1</sub>Hex<sub>2</sub>) and 730 (HexNAc<sub>1</sub>Hex<sub>3</sub>).

 $\alpha$ -mannosidosis. The MALDI mass spectrum depicted in Figure 6A shows the underivatized high mannose type *N*-glycans, with one GlcNAc residue at the reducing end, accumulating in urine of a patient suffering from  $\alpha$ -mannosidosis. After  $\alpha$ -mannosidase digestion (Figure 6B), the pseudomolecular ions corresponding to hypothesized  $\alpha$ -mannosides were abolished and a major ion was observed at m/z 406 (HexNAcHex) corresponding to the Man( $\beta$ 1-4)GlcNAc dissacharide.

Sandhoff disease. The Figure 6C shows the MALDI mass spectrum of the purified underivatized oligosaccharides accumulated in urine of a patient suffering from Sandhoff disease. After *N*-acetyl- $\beta$ -hexosaminidase treatment (Figure 6D), the major ions observed in Figure 6C were abolished and the resulting MALDI mass profile was characterized by two major pseudomolecular ions at *m*/*z* 568 (HexNAc<sub>1</sub>Hex<sub>2</sub>) and 730 (HexNAc<sub>1</sub>Hex<sub>3</sub>).

# DISCUSSION

We have developed a strategy to screen oligosaccharidurias, accomplished by few simple steps. For the screening step,  $20 \ \mu$ L of urine is needed and a unique step of chemical derivatization of urinary glycocompounds is involved without any previous purification. First, the GC-MS analysis of the permethylated glycocompounds makes it possible to rapidly detect an abnormal excretion of sialic acid that is observed in patients suffering from SASD. If an abnormal excretion of sialic acid is detected, the sialic acid can be quantified using an external standard. After this first analysis, the rest of the permethylated glycocompounds is purified on a Sep Pack C18 and analyzed using MALDI-TOF-MS. The MALDI-TOF-MS allows simultaneously analysing oligosaccharides and glycopeptides, which are urinary excreted in a great amount during glycoproteinoses.

The permethylation derivatization offers several advantages [65]. Methylated glycocompounds are ionized more efficiently than their native counterparts, allowing the detection of even trace glycans. The purification of the methylated derivatives using chloroform extraction followed by several washes with water allows the separation of permethylated glucidic material from peptides, proteins, salts, known to be particularly abundant in urine. Permethylation also allows the stabilization of sialic acid residues and prevents the in-source and post-source fragmentation of sialylated oligosaccharides. This stabilisation of sialic acid makes the ionisation efficiency of sialylated oligosaccharides equivalent to that of neutral oligosaccharides, allowing then their simultaneous analysis in the positive ion mode. Moreover, the MALDI-TOF-MS allows measuring (i) the *m*/*z* ratio, which can directly be assigned to a putative monosaccharidic composition, and then leads, in certain case, to a tentative structural assignment; (ii) the signal strength of each ionized oligosaccharide/glycopeptide which reflects the relative amount of the glycocompound present in the sample [66,67] and can be expressed as relative intensity, from which a relative quantification of each species is possible [68].

The methodology described in this paper has been applied to urines from patients suffering from French-type sialuria,  $\alpha$ -sialidosis, Morquio type B disease, Sandhoff disease,  $\alpha$ -mannosidosis,  $\alpha$ -fucosidosis, aspartylglucosaminuria, ICD and GSD-II. The results obtained were consistent with a deep change of the urinary oligosaccharide profiles associated with either increase of intensity of some pseudomolecular ions that are normally present in urine of healthy subjects (GSD-II), or occurence of new abundant signals, corresponding to *N*-glycan structures, with one GlcNAc residue at the reducing end and/or glycopeptides. The MALDI-TOF mass analysis of the urinary glycocompounds allowed a complete profiling of all the accumulating structures previously

described for each disease. In addition, in some cases, some minor glycocompounds were detected for the first time.

The major glycocompounds seen in these diseases were not detectable in a series of 20 urines from normal individuals, so this mass spectrometric strategy can be used to screen these pathologies. These initial screening experiments assist in deciding whether or not to investigate glycan structure in more detail. If abnormal glycocompounds were detected, then we performed a structural analysis on the remaining pool of glycans. In addition, other techniques such as HPLC with an internal standard can be used if these glycocompounds need to be precisely quantified.

It is important to note that sulphated glycocompounds can not be detected using this strategy. Purification of the sulphated oligosaccharides, under conditions described in material and methods, is not possible due to the instability of the sulphomethylester derivatives in aqueous environment, leading to a decreased solubility of the permethylated sulphated compounds in the chloroform phase. To avoid this problem, detection of sulphated components, like those found in urine of patients suffering from mucopolysaccharidoses [69], can be realized by introducing a chemical desulphation step before conducting the permethylation process.

Over the last twenty years, numerous mass spectrometry-based approaches were developed for high-throughput newborn screening for inherited metabolic disorders [22,23]. Contrary to the most available methods for investigating oligosacchariduria profiles, the method proposed in this paper gives rise to the ability to detect glycopeptides and oligosaccharides in urine. In addition, the broad application, the speed and sensitivity of this approach make this a powerful technique. Determination of the glycocompounds structures present in urine constitutes an important step toward the discovery of glycobiomarkers which could be used for the diagnosis and/or prognosis of several acquired or congenital diseases, characterized by defects of glycoconjugates metabolism. The structural analysis of the glycobiomarkers also allows determining the origin of the metabolic defects as well as provides insights into their involvement in the pathophysiology. We are currently applying this approach combined with thin-layer chromatography on silica gel plates to analyze urine from uncharacterized patients suffering from several unknown metabolic diseases.

# ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (Unité Mixte de Recherche CNRS/USTL 8576), the Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur. The Mass Spectrometry facility used in this study was funded by the European Community (FEDER), the Région Nord-Pas de Calais (France) and the Université des Sciences et Technologies de Lille.

$[M+Na]^+$	Assignment	$[M+Na]^+$	Assignment
(m/z)		(m/z)	
477	Hex <sub>2</sub>	1316	HexNAc <sub>2</sub> Hex <sub>2</sub> dHex <sub>2</sub>
491	HexUA <sub>1</sub> Hex <sub>1</sub>	1329	NeuAc <sub>1</sub> HexNAc <sub>2</sub> Hex <sub>2</sub>
518	HexNAc <sub>1</sub> Hex <sub>1</sub>	1335	HexNAc <sub>1</sub> Hex <sub>5</sub>
634	NeuAc <sub>1</sub> Hex <sub>1</sub>	1375	HexNAc <sub>2</sub> Hex <sub>4</sub>
651	$Hex_2 dHex_1$	1404	HexUA <sub>2</sub> HexNAc <sub>2</sub> Hex <sub>2</sub>
681	Hex <sub>3</sub>	1416	HexNAc <sub>3</sub> Hex <sub>3</sub>
692	HexNAc <sub>1</sub> Hex <sub>1</sub> dHex <sub>1</sub>	1498	Hex <sub>7</sub>
722	HexNAc <sub>1</sub> Hex <sub>2</sub>	1520	HexNAc <sub>2</sub> Hex <sub>3</sub> dHex <sub>2</sub>
825	Hex <sub>2</sub> dHex <sub>2</sub>	1690	NeuAc <sub>2</sub> HexNAc <sub>2</sub> Hex <sub>2</sub>
838	NeuAc <sub>1</sub> Hex <sub>2</sub>	1694	HexNAc <sub>2</sub> Hex <sub>3</sub> dHex <sub>3</sub>
879	NeuAc <sub>1</sub> HexNAc <sub>1</sub> Hex <sub>1</sub>	1702	Hex <sub>8</sub>
885	Hex <sub>4</sub>	1737	NeuAc <sub>1</sub> HexNAc <sub>2</sub> Hex <sub>4</sub>
896	HexNAc <sub>1</sub> Hex <sub>2</sub> dHex <sub>1</sub>	1826	HexNAc <sub>3</sub> Hex <sub>5</sub>
926	HexNAc <sub>1</sub> Hex <sub>3</sub>	1906	Hex <sub>9</sub>
954	HexUA <sub>2</sub> HexNAc <sub>1</sub> Hex <sub>1</sub>	1982	NeuAc <sub>1</sub> HexNAc <sub>3</sub> Hex <sub>4</sub>
967	HexNAc <sub>2</sub> Hex <sub>2</sub>	2112	Hex <sub>10</sub>
1071	HexNAc <sub>1</sub> Hex <sub>2</sub> dHex <sub>2</sub>	2187	NeuAc <sub>1</sub> HexNAc <sub>3</sub> Hex <sub>5</sub>
1090	Hex <sub>5</sub>	2316	Hex <sub>11</sub>
1101	HexNAc <sub>1</sub> Hex <sub>3</sub> dHex <sub>1</sub>	2549	NeuAc <sub>2</sub> HexNAc <sub>3</sub> Hex <sub>5</sub>
1131	HexNAc <sub>1</sub> Hex <sub>4</sub>	2794	NeuAc <sub>2</sub> HexNAc <sub>4</sub> Hex <sub>5</sub>
1159	HexUA <sub>2</sub> HexNAc <sub>1</sub> Hex <sub>2</sub>	2969	NeuAc <sub>2</sub> HexNAc <sub>4</sub> Hex <sub>5</sub> dHex <sub>1</sub>
1171	HexNAc <sub>2</sub> Hex <sub>3</sub>	3361	NeuAc <sub>3</sub> HexNAc <sub>4</sub> Hex <sub>6</sub>
1241	NeuAc <sub>2</sub> HexNAc <sub>1</sub> Hex <sub>1</sub>	3606	NeuAc <sub>3</sub> HexNAc <sub>5</sub> Hex <sub>6</sub>
1275	Hex <sub>2</sub> dHex <sub>2</sub>	3780	$NeuAc_3HexNAc_5Hex_6dHex_1$

**Table 1:** Assignments of molecular [M+Na]<sup>+</sup> ions observed in the MALDI spectra of permethylated urinary glycocompounds from two healthy subjects.

These pseudomolecular ions correspond to those observed in figure 2, and to those most often met in most of the A blood group healthy subjects tested, although a very high variability exists among secretor persons, even possessing the same blood group.

## REFERENCES

- [1] Wraith, J.E. Lysosomal disorders. Semin. Neonatol. 2002, 1, 75-83.
- [2] Michalski, J.C. Normal and pathological catabolism of glycoproteins. In: Montreuil J, Vliegenthart JFG, Schachter H, eds Glycoproteins and disease. Amsterdam: Elsevier Science BV 1996; 55–97.
- [3] Thomas, G.H. Disorders of glycoprotein degradation: α-mannosidosis, β-mannosidosis, fucosidosis, and sialidosis. In: Scriver SR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds The metabolic and molecular basis of inherited disease, McGraw-Hill, London 2001; 3507–33.
- [4] Tondeur, M., Vamos-Hurwitz, E., Mockel-Pohl, S., Dereumess J.P., Cremer, N., Loeb, H. Clinical, biochemical, and ultrastructural studies in a case of chondrodystrophy presenting the I-cell phenotype in tissue culture. *J. Pediatr.* 1971, 79, 366-785.
- [5] Kumar, T.S., Scott, J.X., Raghupathy, P., Moses, P.D. Mucolipidosis II (I-cell disease). J. Postgrad. Med. 2005, 51, 232-3.
- [6] Cori, G.T. Biochemical aspects of glycogen deposition disease. *Bibl. Paediatr.* 1958, *14*, 344-58.
- [7] Hallgren, P., Hansson, G., Henriksson, K.G., Hager, A., Lundblad, A., Svensson, S. Increased excretion of a glucose-containing tetrasaccharide in the urine of a patient with glycogen storage disease type II (Pompe's disease). *Eur. J. Clin. Invest.* 1974, *4*, 429-433.
- [8] Hancock, L.W., Thaler, M.M., Horwitz, A.L., Dawson, G. Generalized N-acetylneuraminic acid storage disease: quantitation and identification of the monosaccharide accumulating in brain and other tissues. *J. Neurochem.* 1982, *38*, 803-809.
- [9] Tondeur, M., Libert, J., Vamos, E., van Hoof, F., Thomas, G.H., Strecker, G. Infantile form of sialic acid storage disorder: clinical, ultrastructural, and biochemical studies in two siblings. *Eur. J. Pediatr.* 1982, *139*, 142–147.
- [10] Aula, P., Autio, S., Raivio, K.O., Rapola, J., Thodén, C.J., Koskela, S.L., Yamashina, I."Salla disease": a new lysosomal storage disorder. *Arch. Neurol.* 1979, *36*, 88–94.
- [11] Fontaine, G., Gaudier, B., Biserte, G., Montreuil, J., Dupont, A., Farriaux, J.P. Permanent urinary elimination of free sialic acid in a 3-year-old child affected with diverse clinical disorders. *Pediatrie* 1967, 22, 705-9.
- [12] Gopaul, K.P., Crook, M.A. The inborn errors of sialic acid metabolism and their laboratory investigation. *Clin. Lab.* 2006, *52*, 155-69.

- [13] Aula, N., Aula, P. Prenatal diagnosis of free sialic acid storage disorders (SASD). Prenat. Diagn. 2006, 26, 655-8.
- [14] Warren, L. The thiobarbituric acid assay of sialic acids. J. Biol. Chem. 1959, 234, 1971-5.
- [15] Paschke, E., Gruber, W., Ring, E., Sperl, W. Storage material from urine and tissues in the nephropathic phenotype of infantile sialic acid storage disease. J. Inherit. Metab. Dis. 1992, 15, 47-56.
- [16] Stankovics, J., Molnar, D., Burus, I., Pinter, Z. Infantile sialic acid storage disease diagnosed by gas chromatography-mass spectroscopy analyses of urine sample. J. Inherit. Metab. Dis. 1997, 20, 728-9.
- [17] Meikle, P.J., Fietz, M.J., Hopwood, J.J. Diagnosis of lysosomal storage disorders: current techniques and future directions. *Expert. Rev. Mol. Diagn.* 2004, *4*, 677-91.
- [18] Kin, N.M., Wolfe, L.S. High-performance liquid chromatographic analysis of oligosaccharides and glycopeptides accumulating in lysosomal storage disorders. *Anal. Biochem.* 1980, *102*, 213-9.
- [19] Hommes, F.A., Varghese, M. High-performance liquid chromatography of urinary oligosaccharides in the diagnosis of glycoprotein degradation disorders. *Clin. Chim. Acta.* 1991, 203, 211–24.
- [20] Peelen, G.O.H., de Jong, J.G.N., Wevers, R.A. HPLC analysis of oligosaccharides in urine from oligosaccharidosis patient. *Clin. Chem.* 1994, *40*, 914–21.
- [21] Starr, C.M., Klock, J.C., Skop, E., Masada, I., Giudici, T. Fluorophore assisted electrophoresis of urinary carbohydrates for the identification of patients with oligosaccharidosis and mucopolysaccharidosis-type lysosomal storage diseases. *Glycosylation Dis.* 1994, *1*, 165–70.
- [22] Roschinger, W., Olgemoller, B., Fingerhut, R., Liebl, B., Roscher, A.A. Advances in analytical mass spectrometry to improve screening for inherited metabolic diseases. *Eur. J. Pediatr.* 2003, 1, 67-76.
- [23] Want, E.J., Cravatt, B.F., Siuzdak, G. The expanding role of mass spectrometry in metabolite profiling and characterization. *Chem. Biochem.* 2005, *6*, 1941-51.
- [24] Rozaklis, T., Ramsay, S.L., Whitfield, P.D., Ranieri, E., Hopwood, J.J., Meikle, P.J. Determination of oligosaccharides in Pompe disease by electrospray ionization tandem massspectrometry. *Clin. Chem.* 2002, 48, 131-9.

- [25] Meikle, P.J., Fuller, M., Hopwood, J.J. Mass spectrometry in the study of lysosomal storage disorders. *Cell Mol. Biol.* 2003, 49, 769-77.
- [26] Young, S.P., Stevens, R.D., An, Y., Chen, Y.T., Millington, D.S. Analysis of a glucose tetrasaccharide elevated in Pompe disease by stable isotope dilution-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 2003, *316*, 175-80.
- [27] Ramsay, S.L., Meikle, P.J., Hopwood, J.J., Clements, P.R. Profiling oligosaccharidurias by electrospray tandem mass spectrometry: quantifying reducing oligosaccharides. *Anal. Biochem.* 2005, 345, 30-46.
- [28] Klein, A., Lebreton, A., Lemoine, J., Perini, J.M., Roussel, P., Michalski, J.C. Identification of urinary oligosaccharides by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin. Chem.* 1998, 44, 2422-8.
- [29] Ciucanu, I., Kerek, F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydr. Res.* 1984, *131*, 209.
- [30] Lundblad, A. Oligosaccharides from human urines. *Methods Enzymol.* 1978, 50, 226–35.
- [31] Huttunen, J.K. Neuraminic acid-containing oligosaccharides of human urine: isolation and identification of di-N-acetylneuraminyl-3-galactosyl-N-acetylgalactosamine, 6-2-Nacetylneuraminyl-lactose, 6-2-N-acetylneuraminyl-N-acetyllactosamine and 3-2-Nacetylneuraminyl-lactose. Ann. Med. Exp. Biol. Fenn 1966, 44, 1-60.
- [32] Lundblad, A., Svensson, S. Letters: The structure of a urinary difucosyl pentasaccharide, characteristic of secretors with the blood-group A gene. *Carbohydr. Res.* 1973, *30*, 187-9.
- [33] Parkkinen, J., Finne, J. Isolation and structural characterization of five major sialyloligosaccharides and a sialylglycopeptide from normal human urine. *Eur. J. Biochem.* 1983, 136, 355-61.
- [34] Durand, P., Gatti, R., Cavalieri, S., Borrone, C., Tondeur, M., Michalski, J.C., Strecker, G. Sialidosis & Mucolipidosis. *Helv. Paediatr. Acta* 1977, *32*, 391-400.
- [35] Strecker, G., Hondi-Assah, T., Fournet, B., Spik, G., Montreuil, J., Maroteaux, P., Durand, P., Farriaux, J.P. Structure of the three major sialyl-oligosaccharides excreted in the urine of five patients with three distinct inborn diseases: "I cell disease" and two new types of mucolipidosis. *Biochim. Biophys. Acta.* 1976, 444, 349-58.
- [36] Michalski, J.C., Strecker, G., Fournet, B. Structures of sialyl-oligosaccharides excreted in the urine of a patient with Mucolipidosis I. *FEBS Lett.* 1977, *79*, 101-4.

- [37] Van Pelt, J., Kamerling, J.P., Vliegenthart, J.F., Verheijen, F.W., Galjaard, H. Isolation and structural characterization of sialic acid-containing storage material from mucolipidosis I (sialidosis) fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta* 1988, 965, 36-45.
- [38] Kuriyama, M., Ariga, T., Ando, S., Suzuki, M., Yamada, T., Miyatake, T. Four positional isomers of sialyloligosaccharides isolated from the urine of a patient with sialidosis. *J. Biol. Chem.* 1981, 256, 12316-2.
- [39] Paschke, E., Kress, H. Morquio disease type B: activation of GM1-beta-galactosidase by GM1-activator protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 1982, *109*, 568-75.
- [40] Michalski, J.C., Strecker, G., van Halbeek, H., Dorland, L., Vliegenthart, J.F. The structures of six urinary oligosaccharides that are characteristic for a patient with Morquio syndrome type B. *Carbohydr. Res.* 1982, *100*, 351-63.
- [41] Michalski, J.C., Lemoine, J., Wieruszeski, J.M., Fournet, B., Montreuil, J., Strecker, G. Characterization of a novel type of chain-terminator Gal beta 1-6Gal beta 1-4)GlcNAc in an oligosaccharide related to N-glycosylated protein glycans isolated from GM1 the urine of patients with gangliosidosis. *Eur. J. Biochem.* 1991, *198*, 521-6.
- [42] Sandhoff, K., Christomanou, H. Biochemistry and genetics of gangliosidoses. *Hum. Genet.* 1979, 50, 107-43.
- [43] Ng-Ying-Kin, N.M., Wolfe, L.S. Oligosaccharides accumulating in the liver from a patient with GM2-gangliosidosis variant O (Sandhoff-Jatzkewitz disease). *Biochem. Biophys. Res. Commun* 1974, 59, 837-844.
- [44] Strecker, G., Herlant-Peers, M.C., Fournet, B., Montreuil, J. Structure of seven oligosaccharides excreted in the urine of a patient with Sandhoff's disease (GM2 gangliosidosis-variant O). *Eur. J. Biochem.* 1977, *81*, 165-71.
- [45] Warner, T.G., de Kremer, R.D., Sjoberg, E.R., Mock, A.K. Characterization and analysis of branched-chain N-acetylglucosaminyl oligosaccharides accumulating in Sandhoff disease tissue. Evidence that biantennary bisected oligosaccharide side chains of glycoproteins are abundant substrates for lysosomes. J. Biol. Chem. 1985, 260, 6194-9.
- [46] Ockerman PA. A generalized storage disorder resembling Hurler's syndrome. Lancet II 1967; 239-241.
- [47] Berg, T., Riise, H.M.F., Hansen, G.M., Malm, D., Tranebjaerg, L., Tollersrud, O.K., Nilssen, Ø. Spectrum of mutations in α-mannosidosis. Am. J. Hum. Genet. 1999, 64, 77-88.
- [48] Norden, N.E., Lundblad, A., Svensson, S., Autio, S. Characterization of two mannosecontaining oligosaccharides isolated from the urine of patients with mannosidosis. *Biochemistry* 1974, 13, 871-4.
- [49] Van Halbeek, H., Dorland, L., Veldink, G.A., Vliegenthart, J.F., Strecker, G., Michalski, J.C., Montreuil, J., Hull, W.E. A 500 MHz 1H NMR study of urinary oligosaccharides from patients with mannosidosis. *FEBS Lett.* 1980, *121*, 71-7.
- [50] Yamashita, K., Tachibana, Y., Mihara, K., Okada, S., Yabuuchi, H., Kobata, A. Urinary oligosaccharides of mannosidosis. *J. Biol. Chem.* 1980, 255, 5126-33.
- [51] Pollitt, R.J., Jenner, F.A., Merskey, H. Aspartylglycosaminuria. An inborn error of metabolism associated with mental defect. *Lancet* 1968, 2, 253-5.
- [52] Maury, C.P. Aspartylglycosaminuria: an inborn error of glycoprotein catabolism. J. Inherit. Metab. Dis. 1982, 5, 192-6.
- [53] Liu, X., McNally, D.J., Nothaft, H., Szymanski, C.M., Brisson, J.R., Li, J. Mass spectrometry-based glycomics strategy for exploring N-linked glycosylation in eukaryotes and bacteria. *Anal. Chem.* 2006, 78, 6081-7.
- [54] Lundblad, A., Masson, P.K., Norden, N.E. Structural determination of three glycoasparagines isolated from the urine of a patient with Aspartylglycosaminuria. *Eur. J. Biochem.* 1976, 67, 209-14.
- [55] Sugahara, K., Funakoshi, S., Funakoshi, I., Alla, P., Yamashina, I. Characterization of one neutral and two acidic glycoasparagines isolated from the urine of patients with aspartylglycosylaminuria (AGU). J. Biochem. 1976, 80, 195-201.
- [56] Sugahara, K., Funakoshi, S., Funakoshi, I., Aula, P., Yamashina, I. Characterization of two glycoasparagines isolated from the urine of patients with aspartylglycosylaminuria (AGU). J. *Biochem.* 1975, 78, 673-8.
- [57] Irie, F., Murakoshi, H., Suzuki, T., Suzuki, Y., Kon, K., Ando, S., Yoshida, K., Hirabayashi, Y. Characterization of four monosialo and a novel disialo Asn N-glycosides from the urine of a patient with aspartylglycosaminuria. *Glycoconj. J.* 1995, *12*, 290-7.
- [58] Pollitt, R.J., Pretty, K.M. The glycoasparagines in urine of a patient with aspartylglycosaminuria. *Biochem. J.* 1974, *141*, 141-6.
- [59] Kousseff, B.G., Beratis, N.G., Danesino, C., Hirschhorn, K. Letter: Genetic heterogeneity in fucosidosis. *Lancet* 1973, *2*, 1387-8.

- [60] Durand, P., Borrone, C., Della Cella, G. Fucosidosis. J. Pediatr. 1969, 75, 665-743.
- [61] Patel, V., Watanabe, I., Zeman, W. Deficiency of alpha-L-fucosidase. *Science* 1972, *176*, 426-7.
- [62] Yamashita, K., Tachibana, Y., Takada, S., Matsuda, I., Arashima, S., Kobata, A. Urinary glycopeptides of fucosidosis. *J. Biol. Chem.* 1979, 254, 4820-7.
- [63] Strecker, G., Fournet, B., Montreuil, J. Structure of the three major fucosylglycoasparagines accumulating in the urine of a patient with fucosidosis. *Biochimie* 1978, 60, 725-34.
- [64] Michalski, J.C., Wieruszeski, J.M., Alonso, C., Cache, P., Montreuil, J., Strecker, G. Characterization and 400-MHz 1H-NMR analysis of urinary fucosyl glycoasparagines in fucosidosis. *Eur. J. Biochem.* 1991, 201, 439-58.
- [65] Morelle, W., Michalski, J. C. Analysis of protein glycosylation by mass spectrometry. *Nat. Protoc.* 2007, *2*, 1585-1602.
- [66] Harvey, D.J. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of carbohydrates. *Mass Spectrom. Rev.* 1999, *18*, 349-450.
- [67] Morelle, W., Michalski, J. C. Glycomics and mass spectrometry. *Curr. Pharmaceut. Design.* 2005, *11*, 2615–2645.
- [68] Wada, Y., Azadi, P., Costello, C.E., Dell, A., Dwek, R.A, *et al.* Comparison of the methods for profiling glycoprotein glycans--HUPO Human Disease Glycomics/Proteome Initiative multi-institutional study. *Glycobiology* 2007, *17*, 411-22.
- [69] Neufeld, E.F., Muenzer, J. In Scriver CR, Beaudet, AL, Sly WS, and Valle D. The mucopolysaccharidoses. In Scriver CR, Beaudet, AL, Sly WS, and Valle D. Eds The metabolic and molecular bases of inherited disease, 8th ed McGraw-Hill, New York, 2001; 3421-3452.

## **LEGENDS**:

Scheme 1: Strategy employed to screen oligosaccharidurias.

Figure 1: GC-MS profile of the low molecular weight permethylated urinary glycocompounds of a patient suffering from French-type sialuria (A) and the EI mass spectrum of the major compound, identified as NeuAc (B). After lyophilisation, glycocompounds contained in urine (20  $\mu$ L) were permethylated and subjected to a chloroform/water partitioning. After an extensive wash, an aliquot (0.2% (v/v)) of the chloroform phase was directly analysed by GC-MS.

Figure 2: MALDI-TOF mass spectra of the permethylated urinary glycocompounds from a blood group A secretor female (A, B) and a blood group A non-secretor male (C, D). Glycocompounds contained in urine (20  $\mu$ L) were permethylated, and purified onto a C18 Sep-Pak cartridge. The permethylated derivatives were then analysed by MALDI-TOF-MS in the positive ion reflective mode as [M+Na]<sup>+</sup>. The compositional assignment of the major signals is listed in Table 1.

Figure 3: MALDI-TOF mass spectra of the permethylated urinary glycocompounds from patients suffering from sialidosis (A), I-Cell Disease (B), Morquio type B disease (C) and Sandhoff disease (D). Glycocompounds contained in 20  $\mu$ L of urine were permethylated, and purified onto a C18 Sep-Pak cartridge. The permethylated derivatives were then analysed by MALDI-TOF-MS in the positive ion reflective mode as [M+Na]<sup>+</sup>. Only the structures of the major *N*-glycans are given. **a.** the antenna may be branched either on the ( $\alpha$ 1,3)-arm or the ( $\alpha$ 1,6)-arm. Galactose (open circles); mannose (closed circles); GlcNAc (closed squares); fucose (open triangles); NeuAc (closed diamonds).

Figure 4: MALDI-TOF mass spectra of the permethylated glycocompounds from urine of patients suffering from  $\alpha$ -mannosidosis (A), GSD-II (B), aspartylglucosaminuria (C) and fucosidosis (D). Glycocompounds contained in 20 µL of urine were permethylated, and purified onto a C18 Sep-Pak cartridge. The permethylated derivatives were then analysed by MALDI-TOF-MS in the positive ion reflective mode as [M+Na]<sup>+</sup>. Only the structures of the major *N*-glycans are given. **a.** the antenna may be branched either on the ( $\alpha$ 1,3)-arm or the ( $\alpha$ 1,6)-arm. **b.** the Man residue may be either the ( $\alpha$ 1,3)-linked or ( $\alpha$ 1,6)-linked to the  $\beta$ -Man residue. Galactose (open circles); mannose (closed circles); GlcNAc (closed squares); fucose (open triangles); NeuAc (closed diamonds).

Figure 5 : MALDI-TOF mass spectra of the urinary *N*-glycans excreted in a patient suffering from sialidosis after on-plate treatment with  $\alpha$ -sialidase (A),  $\alpha$ -sialidase and  $\beta$ -galactosidase (B) and  $\alpha$ -sialidase,  $\beta$ -galactosidase and N-acetyl- $\beta$ -hexosaminidase (C). The glycocompounds were separated from peptides, proteins and others hydrophobic contaminants using a C18 Sep-Pak cartridge and desalted on a non-porous graphitized carbon solid phase extraction cartridge. The glycans were analysed in positive ion reflective mode as [M+Na]<sup>+</sup>. Galactose (open circles); mannose (closed circles); GlcNAc (closed squares); fucose (open triangles); NeuAc (closed diamonds).

Figure 6 : MALDI-TOF mass spectra of the urinary *N*-glycans excreted in a patient suffering from  $\alpha$ -mannosidosis before (A) and after on-plate treatment with  $\alpha$ -mannosidase (B); and in a patient suffering from Sandhoff disease before (C) and after on-plate treatment with N-acetyl- $\beta$ -hexosaminidase (D). The glycocompounds were separated from peptides, proteins and others hydrophobic contaminants using a C18 Sep-Pak cartridge and desalted on a non-porous graphitized carbon solid phase extraction cartridge. The glycans were analysed in positive ion reflective mode as [M+Na]<sup>+</sup>. **a.** the antenna may be branched either on the ( $\alpha$ 1,3)-arm or the ( $\alpha$ 1,6)-arm. **b.** the Man residue may be either the ( $\alpha$ 1,3)-linked or ( $\alpha$ 1,6)-linked to the  $\beta$ -Man residue. Galactose (open circles); mannose (closed circles); GlcNAc (closed squares); fucose (open triangles); NeuAc (closed diamonds).

P. P.







Wiley-VCH







Wiley-VCH



Wiley-VCH

# 2.2- Identification et caractérisation de nouveaux oligosaccharides excrétés dans l'urine d'un patient atteint de β-mannosidose

## 2.2.1- Profilage MALDI-MS des oligosaccharides urinaires perméthylés de βmannosidose

La méthode de profilage spectrométrique des oligosaccharides urinaires totaux a également été appliquée à l'étude de l'urine d'un patient atteint de  $\beta$ -mannosidose. Comme nous l'avions mentionné, dans la seconde partie de l'exposé bibliographique, cette pathologie est causée par une déficience en  $\beta$ -mannosidase lysosomale (Bedilu & Nummy, 2002). Les patients souffrant de cette maladie sont caractérisés par une accumulation importante de Man( $\beta$ 1-4)GlcNAc (van Pelt *et al.*, 1990) et de sa forme sialylée NeuAc( $\alpha$ 2-6)Man( $\beta$ 1-4)GlcNAc (van Pelt *et al.*, 1990) dans les tissus et les urines.



Figure 27 : Spectre de masse MALDI-MS des oligosaccharides urinaires totaux d'un patient atteint de  $\beta$ -mannosidose. La perméthylation a été réalisée sur un échantillon de 20  $\mu$ L d'urine non purifiée lyophilisée, suivie d'une purification des dérivés méthylés sur cartouche Sep-Pak C18. L'analyse des oligosaccharides perméthylés, détectés sous la forme d'ions pseudomoléculaires monochargés [M+Na]<sup>+</sup>, a été réalisée en mode réflectron positif. Les signaux diagnostiques majeurs de la  $\beta$ -mannosidose sont notés A-K.

Le spectre de masse MALDI-MS des oligosaccharides urinaires totaux, accumulés dans l'urine d'un patient atteint de  $\beta$ -mannosidose, montré en figure 27, est dominé par un signal intense à m/z 518 (Hex<sub>1</sub>HexNAc<sub>1</sub>, **A**), qui correspond à l'accumulat primaire attendu Man( $\beta$ 1-4)GlcNAc (van Pelt *et al.*, 1990a). Comparé à un spectre de masse MALDI-MS contrôle, le spectre est caractérisé par une augmentation significative de l'intensité du signal de l'ion pseudomoléculaire à m/z 879 (NeuAc<sub>1</sub>Hex<sub>1</sub>HexNAc<sub>1</sub>, **B**), qui dans une urine contrôle, correspond en majorité à du sialyllactosamine NeuAc( $\alpha$ 2-3/6)Gal( $\beta$ 1-4)GlcNAc. En fait, l'accroissement du signal à m/z 879 est due à une excrétion importante en un trisaccharide

sialylé NeuAc(α2-6)Man(β1-4)GlcNAc, qui a été décrit par van Pelt *et al.* (1990b). Ces signaux à m/z 692 (HexNAc<sub>1</sub>Hex<sub>1</sub>dHex<sub>1</sub>) et m/z 1070 (HexNAc<sub>1</sub>Hex<sub>2</sub>dHex<sub>2</sub>), correspondent aux antigènes urinaires à activités de groupe sanguin A, le trisaccharide A GalNAc(α1-3)[Fuc(α1-2)]Gal et le pentasaccharide A GalNAc(α1-3)[Fuc(α1-2)]Gal[Fuc(α1-3)](β1-4)Glc, spécifiques du phénotype antigénique sécréteur Le B / A (Lundblad & Svensson, 1973). Le signal à m/z 967 (Hex<sub>2</sub>HexNAc<sub>2</sub>, **C**) est également augmenté. De plus, d'autres signaux diagnostiques de cette maladie sont détectés à m/z 1141 (Hex<sub>2</sub>HexNAc<sub>2</sub>dHex<sub>1</sub>, **D**), 1315 (Hex<sub>2</sub>HexNAc<sub>2</sub>dHex<sub>2</sub>, **E**), 1328 (NeuAc<sub>1</sub>Hex<sub>2</sub>HexNAc<sub>2</sub>, **F**), 1416 (Hex<sub>3</sub>HexNAc<sub>3</sub>, **G**), 1561 (HexNAc<sub>3</sub>Hex<sub>2</sub>dHex<sub>2</sub>, **H**), 1778 (NeuAc<sub>1</sub>HexNAc<sub>3</sub>Hex<sub>3</sub>, **I**), 1939 (HexNAc<sub>3</sub>Hex<sub>3</sub>dHex<sub>3</sub>, **J**) et 2185 (NeuAc<sub>1</sub>HexNAc<sub>3</sub>Hex<sub>3</sub>dHex<sub>3</sub>, **K**), et correspondent probablement, pour la majorité d'entre eux, à des structures fucosylées à activités de groupe sanguin. En tout onze signaux diagnostiques majeurs de la β-mannosidose ont été détectés et sont notés **A-K**.

# 2.2.2- Séquençage et positionnement des points de branchement des oligosaccharides urinaires deutéroréduits perméthylés par nano-ESI-MS/MS

Le séquencage et le positionnement des points de branchement des oligosaccharides urinaires majeurs diagnostiques de la β-mannosidose (A-K) ont été réalisés par l'analyse nano-ESI-Q/TOF-MS/MS de leur dérivé deutéroréduit (DR) perméthylé. En effet, les oligosaccharides urinaires, contenus dans 100 μL de l'urine d'un patient atteint de β-mannosidose, ont été purifiés sur une cartouche de carbone graphite. Une fraction aliquote des oligosaccharides purifiés a été deutéroréduite, en présence de borodeutérure de sodium, perméthylée, selon la procédure de Ciucanu & Kerek (1984), puis les dérivés méthylés ont été purifiés sur cartouche de Sep-Pak C18. L'analyse des oligosaccharides deutéroréduits perméthylés par MALDI-TOF-MS a permis de confirmer la deutéroréduction des onze oligosaccharides diagnostiques, caractérisés par un accroissement de leur masse moléculaire de 17 Da, comparée à celles précédemment déterminées (Fig. 27). En raison de la très grande hétérogénéité des oligosaccharides urinaires, du phénomène de suppression du signal des ions de haute masse moléculaire (mineurs) par celui des ions de basse masse moléculaire (majeurs), et d'une sensibilité de détection moins bonne, comparée à celle d'une source d'ionisation MALDI, l'analyse des oligosaccharides urinaires deutéroréduits perméthylés en nano-ESI-Q/TOF-MS/MS n'a permis l'obtention d'une séquence complète que pour les cinq ions pseudomoléculaires majeurs [M+Na]<sup>+</sup> à m/z 535 (Hex<sub>1</sub>HexNAc<sub>DR</sub>, A) [M+Na]<sup>+</sup> à m/z 896 (NeuAc<sub>1</sub>Hex<sub>1</sub>HexNAc<sub>DR</sub>, **B**),  $[M+Na]^+$  à m/z 984 (Hex<sub>2</sub>HexNAc<sub>1</sub>HexNAc<sub>DR</sub>, **C**),  $[M+2Na]^{2+}$  à m/z  $677^{2+}$  (dHex<sub>2</sub>Hex<sub>2</sub>HexNAc<sub>1</sub>HexNAc<sub>DR</sub>, **E**) et [M+Na]<sup>+</sup> à m/z 1345 (NeuAc<sub>1</sub>Hex<sub>2</sub>HexNAc<sub>1</sub>HexNAc<sub>DR</sub>, **F**) (Fig. 28).



Figure 28: Spectres de masse d'ions fragments nano-ESI-Q/TOF-MS/MS des ions pseudomoléculaires précurseurs [M+Na]<sup>+</sup> à m/z 896 (NeuAc<sub>1</sub>Hex<sub>1</sub>HexNAc<sub>DR</sub>, B) (A),  $[M+Na]^+$  à m/z 984 (Hex<sub>2</sub>HexNAc<sub>1</sub>HexNAc<sub>DR</sub>, C) (B),  $[M+2Na]^{2+}$ à m/z 677 (dHex<sub>2</sub>Hex<sub>2</sub>HexNAc<sub>1</sub>HexNAc<sub>DR</sub>,  $[M+Na]^+$ m/z E) **(C)** et à 1345 (NeuAc<sub>1</sub>Hex<sub>2</sub>HexNAc<sub>1</sub>HexNAc<sub>DR</sub>, F) (D). Les oligosaccharides urinaires, contenus dans 100 µL de oligosaccharides purifiés ont été deutéroréduits en présence de borodeutérure de sodium. Une fraction aliquote des oligosaccharides deutéroréduits a été perméthylée, puis les dérivés méthylés ont été purifiés sur cartouche de Sep-Pak C18. Les ions fragments sont détectés sous la forme [M+Na]<sup>+</sup>.

La fragmentation CID-MS/MS de ces cinq ions pseudomoléculaires donne lieu à une série complète d'ions fragments Y, générés par rupture des liaisons interglycosidiques, permettant d'attribuer la séquence primaire en monosaccharides et la position des résidus de Fuc. Par exemple, les ions fragments Y1 (m/z 317; HexNAc<sub>DR</sub>), Y2 (m/z 521; Hex1HexNAc<sub>DR</sub>), Y3  $(m/z 766; Hex_1HexNAc_1HexNAc_{DR})$  et Y<sub>4</sub>  $(m/z 970; Hex_2HexNAc_1HexNAc_{DR})$ , obtenus par CID à faible énergie (20 eV) de l'ion pseudomoléculaire [M+Na]+ à m/z 1345 (NeuAc<sub>1</sub>Hex<sub>2</sub>HexNAc<sub>1</sub>HexNAc<sub>DR</sub>, F), permettent d'attribuer sans ambiguïté la séquence NeuAc-Hex-HexNAc-Hex-HexNAc pour le pentasaccharide linéaire sialylé F (Fig. 28C). Les ions fragments B<sub>1</sub> (NeuAc) et B<sub>3</sub> (NeuAc-Hex-HexNAc), respectivement observés à m/z 398 et 847, confirment, en effet, la séquence primaire déduite de la série d'ions fragments Y et que la séquence non réductrice est de type NeuAc-Hex-HexNAc (Fig. 28A et 28B). La fragmentation CID-MS/MS des ions pseudomoléculaires [M+Na]+ à m/z 896 (NeuAc<sub>1</sub>Hex<sub>1</sub>Hex<sub>NAc<sub>DR</sub>, **B**) et [M+Na]+ a m/z 984 (Hex<sub>2</sub>Hex<sub>NAc<sub>1</sub>Hex<sub>NAc<sub>DR</sub>, **C**) a permis</sub></sub></sub> d'attribuer les séquences NeuAc-Hex-HexNAc et Hex-HexNAc-Hex-HexNAc pour les oligosaccharides urinaires diagnostiques B et C, respectivement. Sur le spectre d'ions fragments (Fig. 28D), générés par CID-MS/MS de l'espèce dichargée [M+2Na]<sup>2+</sup> à m/z 677<sup>2+</sup>, les ions fragments  $Y_1$  (m/z 317; HexNAc<sub>DR</sub>),  $Y_2$  (m/z 521; Hex<sub>1</sub>HexNAc<sub>DR</sub>),  $Y_3$  (m/z 940;  $583^{2+}$ :  $dHex_1Hex_1HexNAc_1HexNAc_{DR}$ ) et  $Y_4$ (m/z)1144 et m/z dHex<sub>1</sub>Hex<sub>2</sub>HexNAc<sub>1</sub>HexNAc<sub>DR</sub>) permettent d'attribuer la séquence Fuc-Hex-[Fuc]HexNAc-Hex-HexNAc pour l'oligosaccharide bifucosylé E. De plus, les ions fragments B<sub>1</sub> (m/z 415 ; dHex<sub>1</sub>Hex<sub>1</sub>) et B<sub>2</sub> (m/z 834; dHex<sub>2</sub>Hex<sub>1</sub>HexNAc<sub>1</sub>) permettent de confirmer la position des deux résidus de Fuc sur le résidu d'Hex terminal et le résidu d'HexNAc subterminal.

La sélection des ions pseudomoléculaires correspondant aux autres oligosaccharides (**D**, **G-K**) a donné lieu à l'obtention d'une série incomplète en ions fragments Y, rendant leur séquençage et le positionnement de leurs points de branchement impossibles (spectres non montrés). Quel que soit l'oligosaccharide analysé en CID-MS/MS, y compris ceux qui n'ont été que partiellement caractérisés (**D**, **G-K**), tous les spectres d'ions fragments sont caractérisés par la présence des deux ions fragments  $Y_1$  (m/z 317 ; HexNAc<sub>DR</sub>) et  $Y_2$  (m/z 521 ; Hex<sub>1</sub>HexNAc<sub>DR</sub>), qui permettent d'attribuer la séquence Hex-HexNAc, au niveau de l'extrémité terminale réductrice. Ce résultat indique que la séquence Hex-HexNAc constitue le « noyau » commun aux oligosaccharides urinaires diagnostiques de la  $\beta$ -mannosidose. Ainsi, ces oligosaccharides diffèrent par le prolongement de ce disaccharide par une ou plusieurs unités Hex-HexNAc, terminées soit par un résidu de NeuAc, soit par un ou plusieurs résidus de Fuc, pour former des antigènes à activités de groupe sanguin (Le / ABO).

## 2.2.3- Détermination de la séquence primaire et de la configuration des carbones anomériques par les dégradations exoglycosidasiques et chimiques séquentielles des oligosaccharides urinaires deutéroduits

Afin de confirmer la séquence en monosaccharides, de même que la configuration de leur carbone anomérique, une fraction aliquote des oligosaccharides urinaires deutéroréduits ont été soumis à des dégradations chimiques et exoglycosidasiques séquentielles, suivies de l'analyse des produits de dégradation, sous leur forme méthylée, par MALDI-TOF-MS et nano-ESI-Q/TOF-MS/MS. Cependant, à l'issue de notre thèse, ce travail restant inachevé, seules les analyses MS et MS/MS des produits formés au cours des deux premières étapes de déglycosylation seront présentées. Le spectre MALDI-TOF-MS des oligosaccharides urinaires désialylés est caractérisé par l'absence des ions pseudomoléculaires à m/z 896 (NeuAc<sub>1</sub>Hex<sub>1</sub>Hex<sub>N</sub>Ac<sub>DR</sub>, **B**), 1345 (NeuAc<sub>1</sub>Hex<sub>2</sub>Hex<sub>N</sub>Ac<sub>1</sub>Hex<sub>N</sub>Ac<sub>DR</sub>, **F**) et 1795 (NeuAc<sub>1</sub>Hex<sub>3</sub>HexNAc<sub>2</sub>HexNAc<sub>DR</sub>, I), initialement observés à m/z 879, 1328 et 1778 sur le spectre de masse MALDI-MS de la figure 27, au profit de l'augmentation de l'intensité du pseudomoléculaires 535 signal des ions à m/z $(\text{Hex}_1\text{Hex}\text{NAc}_{\text{DR}}),$ 984 (Hex<sub>2</sub>HexNAc<sub>1</sub>HexNAc<sub>DR</sub>) et 1433 (Hex<sub>3</sub>HexNAc<sub>2</sub>HexNAc<sub>DR</sub>), confirmant ainsi que les oligosaccharides B, F et I sont terminés par un résidu de NeuAc, en position terminale non réductrice.

Après action de la  $\beta$ -mannosidase isolée de *Helix pomatia* sur les oligosaccharides urinaires deutéroréduits désialylés, le spectre de masse MALDI-MS est caractérisé par une diminution significative de l'intensité du signal des ions moléculaires à m/z 535 (Hex1HexNAcDR), 984 (Hex<sub>2</sub>HexNAc<sub>1</sub>HexNAc<sub>DR</sub>) et 1433 (Hex<sub>3</sub>HexNAc<sub>2</sub>HexNAc<sub>DR</sub>), au profit de l'apparition de deux signaux à m/z 780 (Hex<sub>1</sub>HexNAc<sub>1</sub>HexNAc<sub>DR</sub>) et 1229 (Hex<sub>2</sub>HexNAc<sub>2</sub>HexNAc<sub>DR</sub>). Ce résultat indique chacun des ions à m/z 535  $(\text{Hex}_1\text{Hex}\text{NAc}_{\text{DR}}),$ que 984 (Hex<sub>2</sub>HexNAc<sub>1</sub>HexNAc<sub>DR</sub>) et 1433 (Hex<sub>3</sub>HexNAc<sub>2</sub>HexNAc<sub>DR</sub>) correspond à un mélange d'isomères, dont l'un est terminé par un résidu de  $\beta$ -Man. Les produits de démannosylation ont ensuite été fragmentés par collision à faible énergie en nano-ESI-Q/TOF-MS/MS (Fig. 29). Les ions fragments Y permettent d'attribuer sans la moindre ambiguïté les séquences HexNAc-Hex-HexNAc et HexNAc-Hex-HexNAc-Hex-HexNAc, pour les signaux observés à m/z 780 et 1229, respectivement. L'ion B<sub>1</sub> (m/z 282; HexNAc), commun à ces deux ions pseudomoléculaires, confirme bien la présence d'un résidu d'HexNAc en position terminale non réductrice. Ces résultats confirment bien que les structures, observées sous la forme d'ions pseudomoléculaires à m/z 535 (Hex<sub>1</sub>HexNAc<sub>DR</sub>), 984 (Hex<sub>2</sub>HexNAc<sub>1</sub>HexNAc<sub>DR</sub>) et 1433 (Hex<sub>3</sub>HexNAc<sub>2</sub>HexNAc<sub>DR</sub>), par exemple les oligosaccharides **C** et **G**, ou encore les oligosaccharides **F** et **I** désialylés, sont terminées par un résidu de  $\beta$ -Man, en position terminale non réductrice, substituant un résidu d'HexNAc.



Figure 29 : Spectres de masse d'ions fragments nano-ESI-Q/TOF-MS/MS des ions pseudomoléculaires précurseurs  $[M+Na]^+$  à m/z 780 (Hex<sub>1</sub>HexNAc<sub>1</sub>HexNAc<sub>DR</sub>) (A) et  $[M+Na]^+$  à m/z 1229 (Hex<sub>2</sub>HexNAc<sub>2</sub>HexNAc<sub>DR</sub>), correspondant aux deux produits majeurs formés après la digestion par la  $\beta$ -mannosidase isolée de *Helix pomatia* des oligosaccharides deutéroréduits désialylés. La fraction des oligosaccharides deutéroréduits désialylés. La fraction des oligosaccharides deutéroréduits désialylés isolée de *Helix pomatia*. Une fraction aliquote a été perméthylée, puis les dérivés méthylés ont été purifiés sur cartouche de Sep-Pak C18. Les ions fragments sont détectés sous la forme  $[M+Na]^+$ .

## **3- DISCUSSION**

Notre travail de thèse a consisté en la mise au point de méthodologies de glycomique, dédiées au profilage et à la caractérisation structurale des oligosaccharides et des glycopeptides urinaires, qui constituent de précieux indicateurs du catabolisme des glycoprotéines cellulaires. L'urine humaine est connue pour être une source importante en biomarqueurs d'intérêt biologique et clinique (Pisitkun et al., 2006). Elle renferme, notamment, une grande variété de glycopeptides et d'oligosaccharides portant des antigènes à activités de groupe sanguin Le/ABO (Lundblad, 1978). Les oligosaccharides urinaires majeurs possèdent un résidu de Glc en position terminale réductrice et représentent le principal accepteur des glycosyltransférases. Ils dérivent tous, en effet, de la substitution de ce résidu de Glc par des résidus de Gal ou d'un nombre limité d'unités LacNAc, pouvant être terminés par des résidus de Fuc, pour former des antigènes à activités de groupe sanguin Le/ABO, et/ou des résidus d'acide sialique et d'acide uronique (Fig. 30). De plus, une grande variété de N-glycannes partiellement dégradés, ne possédant, pour la plupart, qu'un résidu de GlcNAc en position terminale réductrice, est également présente en faible concentration dans l'urine humaine. Ces N-glycannes, libérés dans les milieux extracellulaires suite à la cytolyse d'une grande variété de types cellulaires, constituent, de fait, de précieux traceurs du catabolisme des glycoprotéines cellulaires.



Figure 30 : Structure composite des oligosaccharides libres urinaires.

Dans un premier temps, nous décrivons une double méthodologie permettant le dépistage rapide (24 heures) et simultané des sialuries et des oligosacchariduries, par la microanalyse en GC-MS et en MALDI-TOF-MS des oligosaccharides et glycoasparagines, contenus dans 20  $\mu$ L d'urine non purifiée, sous leur forme méthylée. La GC-MS permet l'analyse et le dosage des glucides perméthylés de faibles masses moléculaires, tels que les mono-, di- et

trisaccharides et les glycoasparagines à chaîne courte. Ainsi, sous sa forme méthylée, le NeuAc libre urinaire peut être aisément identifié et quantifié par cette approche, permettant ainsi le dépistage et le typage des sialuries, qui, comme nous l'avions mentionné en seconde partie de l'exposé bibliographique, sont caractérisées par des taux d'excrétion urinaire en NeuAc libre différents. Appliquée à l'étude de l'urine d'un patient souffrant d'une sialurie type français, l'analyse GC-MS a révélé un taux d'excrétion urinaire en NeuAc libre 5000 fois supérieur à celui des patients sains, congruent avec ceux attendus (Aula & Gahl, 2001). Une fois l'analyse GC-MS conduite, le même échantillon a ensuite été directement analysé par MALDI-TOF-MS, pour le profilage des oligosaccharides et des glycoasparagines perméthylés, à la recherche d'indicateurs diagnostiques des oligosacchariduries. L'ionisation MALDI est la technique d'ionisation douce la plus sensible, et, de fait, devient incontournable dans la détection et la caractérisation de biomarqueurs d'intérêt biologique et clinique. Couplée à un analyseur TOF, il offre la possibilité de déterminer, avec une importante précision en masse et une grande résolution, la masse moléculaire et la composition en monosaccharides, en termes de NeuAc, d'HexNAc, d'Hex et de dHex, permettant ainsi l'identification partielle des glycopeptides et des oligosaccharides. De plus, l'intensité du signal des ions pseudomoléculaires peut être utilisée pour la quantification relative des dérivés méthylés. Cette méthode a également été validée sur sept modèles de glycoprotéinoses (sialidose, I-Cell disease, maladie de Morquio, maladie de Sandhoff, α-mannosidose, fucosidose et aspartylglucosaminurie) et un modèle de la maladie de Pompe. Quelle que soit la pathologie testée, les spectres de masse MALDI-MS sont caractérisés par la présence de signaux intenses correspondant aux oligosaccharides et aux glycoasparagines diagnostiques, isolés et caractérisés, au cours de travaux antérieurs. La structure primaire de ces structures diagnostiques a été confirmée par des digestions exoglycosidasiques séquentielles sur cible MALDI, réalisées sur une fraction aliquote des oligosaccharides et glycoasparagines urinaires purifiés sur cartouche de carbone graphite (10 pmoles). En utilisant diverses combinaisons d'exoglycosidases, des isomères peuvent ainsi être différenciés. Par ailleurs, cette méthodologie peut également être appliquée au dépistage rapide des mucopolysaccharidoses (MPS). En effet, en utilisant une approche ESI-MS/MS, Fuller et al. (2004) ont pu identifier et quantifier une série d'oligosaccharides sulfatés à chaîne courte (de un à six monosaccharides), constituant des glycobiomarqueurs diagnostiques des MPS. Cependant, compte tenu de l'instabilité des dérivés sulfométhylesterifiés en milieu aqueux, les oligosaccharides sulfatés perméthylés deviendraient hydrosolubles et ne seraient donc plus extractibles dans le chloroforme avec les autres oligosaccharides et glycopeptides urinaires.

Afin d'éviter ce problème, il est nécessaire d'inclure une étape de désulfatation chimique en milieu acide du matériel glucidique, contenu dans 20  $\mu$ L d'urine non purifiée, avant de conduire sa perméthylation.

L'analyse globale des profils d'excrétions urinaires en oligosaccharides et en glycopeptides, reflets du catabolisme des glycoprotéines cellulaires, permettent, également, de disposer de précieux indicateurs pronostiques spécifiques de certaines pathologies. Ces indicateurs pronostiques peuvent s'avérer très utile, par exemple, dans l'évaluation de l'efficacité thérapeutique de glycoprotéines recombinantes, dans le traitement expérimental de modèles animaux naturels ou transgéniques (souris KO) de diverses glycoprotéinoses. Dans le cadre du contrat européen «HUEMAN», notre laboratoire évalue l'efficacité de la thérapie enzymatique substitutive, par diverses doses de rhLAMAN, expérimentée sur des modèles de souris transgéniques de l'a-mannosidose, par le profilage MALDI-MS des N-glycannes de type oligomannosidique urinaires et tissulaires perméthylés. De plus, il a été montré une corrélation positive entre le taux d'excrétion urinaire en certains oligosaccharides urinaires et certaines pathologies. Ainsi, on a montré, par exemple, que le taux d'excrétion urinaire en sialyllactose et en sialyllactosamine est significativement augmenté au cours de la polyarthrite rhumatoïde (Maury et al., 1982), du lupus systémique érythémateux (Maury et al., 1981), dans certaines infections myocardiques (Huttunen et al., 1972) ou encore de certains cancers gastrointestinaux avancés (Shimada et al., 1995).

Dans un second temps, nous avons appliqué la méthodologie de profilage MALDI-MS, précédemment décrite, à l'étude des oligosaccharides urinaires d'un patient souffrant de  $\beta$ -mannosidose. Nous avons clairement montré une modification du profil d'excrétion urinaire en oligosaccharides, comparé aux profils d'urines témoins, marquée par la présence de onze glycobiomarqueurs diagnostiques de la maladie, dont neuf n'ont jamais été décrits chez l'homme. L'étude structurale de leur dérivé deutéroréduit perméthylé, par nano-ESI-MS/MS, a révélé que ces structures possèdent toutes la séquence Hex-HexNAc, en position terminale réductrice. De plus, comme nous l'avions mentionné plus haut, l'extrémité réductrice des oligosaccharides urinaires majeurs, chez l'homme, est constituée par un résidu de Glc, contrairement aux structures identifiées dans l'urine de ce patient. Ces résultats suggèrent que les oligosaccharides diagnostiques C-K, comme l'oligosaccharide B NeuAc( $\alpha$ 2-6)Man( $\beta$ 1-4)GlcNAc, dériveraient de la substitution, par divers motifs saccharidiques, de l'accumulat primaire Man( $\beta$ 1,4)GlcNAc (oligosaccharide A). Dans cette hypothèse, ce disaccharide serait

substitué par une unité ou deux unités linéaires de Gal( $\beta$ 1-4)GlcNAc ou Man( $\beta$ 1-4)GlcNAc (oligosaccharides C et G), pouvant être terminées soit par un résidu d'acide sialique (oligosaccharides F et I), soit par un nombre variable de résidus de Fuc, pour former des antigènes à activités de groupe sanguin (oligosaccharides D, E, H, J et K) (Fig. 31). Cependant, à ce stade de l'étude, on ne peut attribuer la structure définitive des oligosaccharides diagnostiques de la  $\beta$ -mannosidose. Afin de pouvoir confirmer la structure des oligosaccharides C-K, il est nécessaire de pouvoir les fractionner par HPLC en phase normale, puis d'opérer la caractérisation structurale de leur dérivé deutéroréduit, par nano-ESI-Q/TOF-MS/MS, avant et après leur dégradation chimique et enzymatique séquentielle.



Figure 31 : Structures hypothétiques des oligosaccharides A-G et I.

Des structures homologues ont également été décrites dans l'urine de patients souffrant d'une aspartylglucosaminurie. l'accumulation  $GlcNAc(\beta 1-N)Asn$ En effet, primaire en s'accompagne de l'accumulation secondaire en glycoasparagines plus complexes, constituées d'une séquence linéaire mono-, di-, tri- et tétralactosaminique de type 2, mono- et disialylée, directement N-liée au résidu d'Asn, dans les tissus et l'urine des patients (Pollitt & Pretty, 1974 ; Sugahara et al., 1975, 1976 ; Irie et al., 1995). Ces glycoasparagines, caractérisés par l'absence de noyau N,N'-diacétylchitobiose N-lié au résidu d'Asn, ne dérivent pas du catabolisme des glycoprotéines cellulaires mais constituent des produits d'accumulation secondaires, probablement formés après action des glycosyltransférases golgiennes, libérées suite à la perte de compartimentation subcellulaire, au cours de la cytolyse induite par

l'accumulation massive en GlcNAc( $\beta$ 1-N)Asn. Bien que les accumulats primaires de la fucosidose et de l'aspartylglucosaminurie, aient des similitudes structurales, il n'a jamais été observé, même au cours de notre étude, la formation de glycoasparagines polylactosaminiques au cours de la fucosidose, pour la simple et bonne raison, que le résidu de Fuc lié en ( $\alpha$ 1-6) sur le résidu de GlcNAc N-lié au résidu d'Asn, constitue un signal STOP pour l'élongation du glycopeptide Fuc( $\alpha$ 1-6)GlcNAc( $\beta$ 1-N)Asn. De la même manière, la présence du trisaccharide sialylé NeuAc( $\alpha$ 2-6)Man( $\beta$ 1-4)GlcNAc (oligosaccharide **B**), dans l'urine du patient atteint de  $\beta$ -mannosidose, résulte vraisemblablement d'une sialylation anormale de l'accumulat primaire Man( $\beta$ 1-4)GlcNAc, par une ( $\alpha$ 2-6)-sialyltransférase golgienne libérée suite à la perte de compartimentation subcellulaire, au moment de la cytolyse. On peut donc raisonnablement supposer que les neuf oligosaccharides diagnostiques de la  $\beta$ -mannosidose (**C-K**) ont également été formés par l'addition séquentielle de résidus de  $\beta$ -Gal/ $\beta$ -Man et de  $\beta$ -GlcNAc sur l'accumulat primaire Man( $\beta$ 1-4)GlcNAc, par des glycosyltransférases golgiennes, libérées suite à la perte de compartimentation subcellulaire, au moment de la cytolyse.

Le mode d'addition séquentielle des résidus saccharidiques sur l'accumulat primaire, formé au cours de ces deux maladies, n'est, à l'heure actuelle, pas clairement compris. L'absence de résidu de GlcNAc, en position terminale non réductrice, amène à penser que la synthèse des glycoasparagines complexes résulterait du transfert séquentiel d'unités LacNAc de type 2 « en bloc » sur le glycopeptide GlcNAc(β1-N)Asn. Cette hypothèse est confortée par le fait qu'aucune des structures linéaires, observées dans l'urine du patient atteint de  $\beta$ -mannosidose, ne soit terminée par un résidu de HexNAc, en position terminale non réductrice. De plus, nous avons identifié des structures linéaires tétra- et hexasaccharidiques, terminées par un résidu de β-Man en position terminale non réductrice, pouvant également être sialylées (Fig. 31). Ce type de structure n'a, jusqu'à l'heure actuelle, été décrit que chez la chèvre, sous la forme d'un pentasaccharide Man( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-4)Man( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-4)GlcNAc (Jones & Laine, 1981; Matsuura et al., 1981, 1983; Jones et al., 1992; Gage et al., 1995). Compte tenu de l'absence de  $\beta$ -mannosyltransférase golgienne, chez l'homme, la synthèse de ce type de structure ne peut s'expliquer que par le transfert séquentiel de l'accumulat primaire Man(\beta1-4)GlcNAc sur lui-même. Cependant, des études de biochimie structurale et métabolique complémentaires sont nécessaires à la définition des « voies métaboliques » et à l'identification des effecteurs métaboliques (glycosyltransférases) conduisant à la synthèse de ces métabolites secondaires, formés au cours de l'aspartylglucosaminurie et de la βmannosidose.

## CHAPITRE III :

## PROFILAGES SPECTROMETRIQUES DU N- ET DU O-GLYCOME DES GLYCOPROTEINES SERIQUES POUR LE DEPISTAGE DES ANOMALIES CONGENITALES DE GLYCOSYLATION

1-INTRODUCTION ET OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE	122
1.1-Introduction	122
1.2-Objectifs du travail de thèse	123
2-RESULTATS	123
3-DISCUSSION	124

## 1- INTRODUCTION ET OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE

### **1.1-** Introduction

Les CDG constituent des pathologies multisystémiques congénitales rares affectant la biosynthèse des glycannes des glycoprotéines (prévalence moyenne: 1/20000) (Marquardt & Denecke, 2003 ; Wopereis et al., 2006 ; Freeze, 2007 ; Jaeken & Matthijs, 2001, 2007). Les CDG résultent de dysfonctionnements métaboliques affectant tous les effecteurs de la glycosylation des protéines : les transporteurs de nucléotide-sucres, les enzymes de synthèse des donneurs de sucres activés (Dol-P-sucres et nucléotide-sucres), les glycosyltransférases, les glycosidases, et les protéines structurales du complexe COG. Ces déficits métaboliques rendent compte de l'importance capitale des glycannes des glycoprotéines dans les systèmes biologiques, comme en témoignent la sévérité des présentations cliniques et les taux de morbidité / mortalité élevés, chez les patients. Les patients sont, en effet, caractérisés par de sévères atteintes neurologiques associées à de graves atteintes multiviscérales variées (Jaeken, 2003 ; Jaeken & Matthijs, 2001, 2007). Les CDG sont subdivisés en deux groupes, les CDG-I et II, en fonction de la position de l'étape métabolique bloquante, dans la voie de biosynthèse des N-glycannes. Les CDG-I, les plus fréquentes, sont caractérisées par des déficits enzymatiques au niveau des voies d'assemblage des Dol-P-P-OS, au niveau du RE. Les CDG-II, quant à eux, résultent de défauts des mécanismes de maturation des chaînes N- et Oglycanniques liées aux glycoprotéines, au cours de leur transit au niveau du RE et de l'appareil de Golgi. Sur le plan moléculaire, les CDG conduisent à une diminution des taux d'occupation des sites de N-glycosylation (CDG-I) et/ou à une modification de la structure primaire des chaînes N- et O-glycanniques des glycoprotéines (CDG-II). Les cas de CDG d'étiologie inconnue sont typés CDG-Ix ou -IIx.

Le dépistage biochimique de ces pathologies est basé sur la détection des formes hypoglycosylées de deux modèles glycoprotéiniques sériques standards, la sérotransferrine (STf) et l'apolipoprotéine C-III (apo-CIII), respectivement utilisés comme glycobiomarqueurs d'intérêt des anomalies de la N-glycosylation et de la O-glycosylation de type mucine à noyau 1. En routine, dans les laboratoires de biochimie clinique, le dépistage rapide des CDG est réalisé par IEF de la STf et de l'apo-CIII (Yamashita *et al.*, 1993 ; Wopereis *et al.*, 2003, 2007 ; Marklová & Albahri, 2007). Cependant, les tests d'IEF de la STf et de l'apo-CIII, seuls, ne permettent pas de mettre en évidence tous les types de CDG, ni d'identifier la nature de la voie métabolique bloquante. Par exemple, l'IEF de l'apo-CIII ne permet de détecter que

les déficits en O-glycosylation de mucine à noyau 1, les CDG-IIc, IIe, IIf, IIg et IIh. L'IEF de la STf, quant à elle, ne permet pas de détecter les CDG-IIb, IIc, IIf et la CDA. De plus, certaines pathologies, telles que l'intolérance congénitale au fructose (Jaeken et al., 1996; Adamowicz & Pronicka, 1996), la galactosémie congénitale (Stibler et al., 1997; Charlwood et al., 1998), l'alcoolisme chronique (Stibler et al., 1988; Arndt, 2001), la fibrose cystique (Larsson et al., 1998; Rhim et al., 2004), le syndrome urémique hémolytique (de Loos et al., 2002) ou encore certaines pathologies hépatodégénératives (Stibler & Hultcrantz, 1988), conduisent également à une modification des profils d'IEF de la STf et constituent des anomalies secondaires de la glycosylation. Par ailleurs, comme nous l'avions mentionné dans le second chapitre de l'exposé bibliographique, le dépistage biochimique d'un CDG peut être confirmé par la détection des formes hypoglycosylées d'autres modèles glycoprotéiniques sériques (Fang et al., 2004), tels que l'antithrombine III (Stibler et al., 1998), l'orosomucoïde (Yuasa *et al.*, 1995), l' $\alpha_1$ -antitrypsine (Mills *et al.*, 2001), l' $\alpha_1$ -antichymotrypsine (Fang et al., 2004). Ainsi, depuis ces cinq dernières années, d'importants efforts ont été concentrés dans l'exploration de la N-glycosylation des protéines sériques totales (Butler et al., 2003 ; Mills et al., 2003).

## 1.2- Objectifs du travail de thèse

Notre travail de thèse s'inscrit dans le cadre de l'institut des maladies rares, et consiste en la mise au point d'approches bioanalytiques globales permettant l'exploration du métabolisme normal et pathologique des glycoprotéines, à haut débit. Dans notre étude, nous proposons une stratégie rapide permettant le profilage simultané des N- et des O-glycannes des glycoprotéines sériques totales par MALDI-TOF-MS, réalisé par la microanalyse de 30  $\mu$ L de sérum sanguin. Cette méthodologie a été appliquée à l'analyse de sérum de patients atteints d'une déficience en GlcNAc T II (CDG-IIa) et d'une déficience en protéine COG 1 (CDG-IIg).

## **2- RESULTATS**

## - Ces travaux font l'objet d'un article publié dans Proteomics :

Faid V, Chirat F, Seta N, Foulquier F, Morelle W. A rapid mass spectrometric strategy for the characterization of N- and O-glycan chains in the diagnosis of defects in glycan biosynthesis. Proteomics. 2007; 7(11):1800-13.

### Valegh Faid<sup>1</sup>, Frédéric Chirat<sup>1</sup>, Nathalie Seta<sup>2</sup>, François Foulquier<sup>3</sup> and Willy Morelle<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Unité Mixte de Recherche CNRS/USTL 8576, Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle,

diagnosis of defects in glycan biosynthesis

Université des Sciences et Technologies de Lille 1, Villeneuve d'Ascq, France

<sup>2</sup> APHP, Hôpital Bichat-Claude Bernard, Biochimie Métabolique et Cellulaire, Paris, France

<sup>3</sup> Molecular Diagnostics, Center for Human Genetics, Gasthuisberg, Katholieke Universiteit

Leuven and Flanders Interuniversity Institute for Biotechnology 4, Leuven, Belgium

Glycosylation of proteins is a very complex process which involves numerous factors such as enzymes or transporters. A defect in one of these factors in glycan biosynthetic pathways leads to dramatic disorders named congenital disorders of glycosylation (CDG). CDG can affect the biosynthesis of not only protein *N*-glycans but also *O*-glycans. The structural analysis of glycans on serum glycoproteins is essential to solving the defect. For this reason, we propose in this paper a strategy for the simultaneous characterization of both *N*- and *O*-glycan chains isolated from the serum glycoproteins. The serum (20  $\mu$ L) is used for the characterization of *N*-glycans which are released by enzymatic digestion with PNGase F. *O*-glycans are chemically released by reductive elimination from whole serum glycoproteins using 10  $\mu$ L of the serum. Using strategies based on mass spectrometric analysis, the structures of *N*- and *O*-glycan chains are defined. These strategies were applied on the sera from one patient with CDG type IIa, and one patient with a mild form of congenital disorder of glycosylation type II (CDG-II) that is caused by a deficiency in the Cog1 subunit of the complex.

#### **Keywords:**

Congenital disorders of glycosylation / Glycans / Glycomics / Glycoproteomics / Mass spectrometry.

Received: December 6, 2006 Revised: January 31, 2007 Accepted: February 23, 2007

#### 1 Introduction

The glycosylation process is the most important and sophisticated modification that affects proteins. With regard to the

**Correspondence:** Dr. Willy Morelle, Unité Mixte de Recherche CNRS/USTL 8576, Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, IFR 118, Bâtiment C9, Université des Sciences et Technologies de Lille 1, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France **E-mail:** willy.morelle@univ-lille1.fr **Fax:** +33-3-20436555

Abbreviations: CDG, congenital disorders of glycosylation; PMAA, partially methylated alditol acetates linkage between the core protein and mono- or oligosaccharide chain, several types of glycans can be distinguished. The two most important ones in terms of abundance are *N*-glycans which are linked to the amine of the amide group of an Asn residue in a consensus sequence Asn-XXX-Thr/Ser [1] and the *O*-glycan chains attached to the hydroxyl group of a hydroxylated aminoacid (most frequently Ser and Thr) [2].

The glycosylation process depends on numerous factors such as (i) the expression of functional glycosyltransferases (involved in the biosynthesis process) or glycosidases (responsible for either the maturation or catabolism process), (ii) proper location of these (ER, Golgi, cytosol, or

InterScience

<sup>© 2007</sup> WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

lysosome), and (iii) the functional machinery of sugar nucleotides (enzymes and transporters). Total or partial deficiency of any of these factors leads to a severe pathology known as congenital disorders of glycosylation (CDG). So far, the main cause for these deficiencies has been the alteration of either one glycosyltransferase or one glycosidase. The classification of CDG relies on the stage of the deficiency: the stage preceding the transfer of Glc<sub>3</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub> to the protein characterizes CDG-I, whereas the stage following this transfer defines CDG-II. Up to now, 12 CDG-I (from Ia to Il) and 6 CDG-II (from IIa to IIf) have been described [3]. Other CDGs remain unsolved and are named CDG-Ix or CDG-IIx. The biochemical diagnosis of CDGs is based on the IEF analysis of the serum transferrin [4]. Using this method, serum transferrin, a glycoprotein containing two biantennary complex type N-glycans, is resolved under three major isoforms named S4, S2, and S0 depending on the number of sialic acid residues carried by N-glycan chains. A cathodic shift of serum transferrin isoforms is indicative of a CDG. However, this rapid and simple method can lead to an underdiagnosis of CDGs, in particular for CDG IIb, IIc, and IIf. Moreover, mitochondrial diseases present a similar IEF profile to that of CDGs and lead to an underdiagnosis of such CDGs [5]. Conversely, in the case of alcohol abuse, nonexisting CDGs can be diagnosed [6]. To overcome these limitations, several techniques have been applied on purified serum transferrin such as ESI-MS [7], LC-MS [8, 9], MALDI-TOF-MS analysis [10], and CZE [11]. To improve the CDG diagnosis and provide better knowledge of the glycosylation process, several other glycoproteins have been investigated into such as antithrombin III, orosomucoid [12] or  $\alpha_1$ -antitrypsin ( $\alpha_1$ -AT), and  $\alpha_1$ -antichymotrypsin [13, 14]. During the past 5 years, new strategies have been developed to screen the glycan chain structures from whole serum glycoproteins [15].

Glycosylation alterations have also been reported for other pathologies such as tumors for which it has been observed that malignant cells synthesized *N*-glycans chains larger than those synthesized by normal cells. This general common feature to malignant cells is known as the "Warren-Glick" phenomenon [16]. For rheumatic diseases, in particular rheumatoid arthritis, the glycosylation pattern of the heavy chain of IgG displays important modifications. Thus, the glycan chains of IgG isolated from rheumatoid arthritis individuals' sera are strongly under galactosylated [17]. Moreover, the fucosylation of *N*-glycan chains appears to be significantly modified. Taken together, the galactosylation and the fucosylation degrees of IgG can be directly correlated to acute and remission phases of the disease [18].

From these various examples, it seems more and more obvious that *N*-glycan chains could be used as new biomarkers, as was clearly evidenced by Callewaert *et al.* [19] for the diagnosis of liver cirrhosis [20]. Thus, a precise characterization of the *N*-glycan structures of glycoproteins isolated from different body fluids is becoming an important challenge.

Several pathologies involving a default in the O-glycan biosynthesis have also been reported. One pathology, the familial tumoral calcinosis [21] is due to a deficiency in N-acetyl-galactosaminyltransferase 3, which is responsible for the attachment of a GalNAc residue to a serine or threonine residue. Another pathology is the progeroid type Ehlers-Danlors (E-D) which was reported to be caused by two mutations in the galactosyltransferase involved in the synthesis of proteoglycans [22]. For these reasons, a test based on the isofocusing of apolipoprotein C-III has recently been developed [23]. Apolipoprotein C-III, which is a glycoprotein containing a unique core 1 mucin type O-glycan, leads to three isoforms differing from one another by the number of sialic acid residues (from 0 to 2). This technique therefore provides the opportunity to study the genetic defects of core 1 O-glycan biosynthesis. Applied to the serum of unsolved CDG type II patients, Wopereis et al. [24] were able to distinguish six different biochemical groups. The major advantage of this subdivision is that it focuses more rapidly on genetic defects by narrowing down the possible options. However, the disadvantage of this technique is that it does not provide any access to the fine O-glycan structures. For example, in apoC-III<sub>0</sub>, it is not possible to distinguish the three possible isoforms which are nonglycosylated apoC-III, apoC-III with a GalNAc residue and apoCIII with the Galß1-3GalNAc disaccharide.

This is why we propose in this paper a strategy based on MALDI-TOF MS to simultaneously characterize the structures of O- and N-glycans released from whole serum glycoproteins. First, N-glycan chains were released from SDSdenaturated serum glycoproteins via PNGase F digestion. Secondly, the O-glycan chains of whole serum glycoproteins were released by a reductive  $\beta$ -elimination treatment. Finally, O- and N-glycans were permethylated and analyzed using MALDI-TOF-MS. Structural assignment was confirmed by on-target glycosidase digestions, chemical treatments, and linkage analysis. This strategy has been applied to the characterization of glycan chains contained in 30 µL of the serum from a patient suffering from a CDG-IIa, and a patient with a mild form of congenital disorder of glycosylation type II (CDG-II) that is caused by a deficiency in the Cog1 subunit of the complex.

#### 2 Materials and methods

#### 2.1 Materials

Control serum samples were obtained from 20 healthy volunteers. A serum sample from a patient suffering from CDGIIa [25] was a gift from Dr. Nathalie Seta. A serum sample from a patient with a mild form of congenital disorder of glycosylation type II (CDG-II) that is caused by a deficiency in the Cog1 subunit of the complex was a gift from Dr. Gert Matthijs [26]. Recombinant peptidyl-*N*-glycosidase F

#### 1802 V. Faid *et al.*

(PNGase F; EC 3.5.1.52) from *Escherichia Coli* and  $\alpha$ -sialidase from *Arthrobacter ureafaciens* were purchased from Roche Molecular Biochemicals (Indianapolis, IN, USA). Bovine testis  $\beta$ -galactosidase (EC 3.2.1.23) and bovine kidney  $\alpha$ -fucosidase (EC 3.2.1.51) were purchased from Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA). *Jack bean*  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidase (EC 3.2.1.30) was purchased for Calbiochem (La Jolla, CA, USA). Sodium cyanoborohydride, DMSO, and iodomethane were from Fluka (Buchs, Switzerland). DTT and iodoacetamide (IAA) were from Bio-Rad (Hercules, CA, USA). Sodium borodeuteride and 2,5-dihydroxybenzoïc acid were purchased from Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA). Methanol, ethanol, ACN, and TFA were of HPLC reagent grade. All the aqueous solutions were prepared using ultrapure water.

# 2.2 Release of the *N*-linked oligosaccharides and clean-up procedure of the PNGase F-released *N*-glycans

Twenty microliter aliquots of sera from healthy persons (control) and patients suffering from CDG were dried in a vacuum centrifuge. The dried samples were dissolved in 200 µL of 50 mM ammonium bicarbonate containing 0.25% w/v SDS and 0.25% v/v  $\beta\text{-mercaptoethanol}$  and subsequently heated for 20 min at 100°C. After adding 200 µL of 50 mM ammonium bicarbonate in the cooled samples, 20 µL of 10% v/v Nonidet P40 and 3 U of PNGase F were successively added and the deglycosylation was incubated at 37°C for 18 h. The PNGase F digestion was terminated by drying in vacuo. The PNGase F released *N*-glycans were purified as previously described [27]. Briefly, N-glycans were desalted on a column of 150 mg of nonporous graphitized carbon (Alltech, Deerfield, IL, USA). The column was sequentially washed with 5 mL methanol and  $2 \times 5$  mL 0.1% v/v TFA. The *N*-glycans were dissolved in 1 mL of 0.1% v/v TFA, applied to the column and washed with  $3 \times 5$  mL of 0.1% v/v TFA. The elution of N-glycans was conducted with the application of 5 mL of 25% v/v ACN in water containing 0.1% v/v TFA. The fractions were freeze-dried.

#### 2.3 Release of the O-linked glycans

Ten microliters of the serum was subjected to reductive elimination according the procedure developed by Carlson [28]. Sodium hydroxide solution (200 µL) containing 1 M NaBH<sub>4</sub> were added to 10 µL of the serum and incubated at 45°C for 16 h. After terminating the reaction with glacial acetic acid, the sample was purified on a column (7 × 0.5 cm of Dowex 50X-8 (H<sup>+</sup> form) and the unbound material was then lyophilized. Borate salts were removed by several evaporations with methanol containing 5% v/v acetic acid and freeze-dried.

#### 2.4 Chemical desialylation of the released *N*- and *O*-glycans

Sialic acid residues were cleaved by treatment of *N*-glycan samples (10%) and *O*-glycan samples (50%) with 2 M acetic acid at  $80^{\circ}$ C for 2 h [29]. After cooling, the samples were freeze-dried.

## 2.5 Release of the *N*-linked glycans after reduction and carboxyamidomethylation of glycoproteins

The proteins/glycoproteins present in 20 µL of the serum were dissolved in 500 µL of 600 mM Tris/HCl pH 8.2 and denatured by guanidine hydrochloride (6 M final concentration). The sample was incubated at 50°C for 2 h. The sample was reduced using 1 mg of DTT. The sample was flushed with argon and incubated at 50°C for 4 h. After addition of 6 mg of IAA, the sample was flushed with argon and incubated at room temperature overnight in the dark. The sample was then extensively dialyzed against 50 mM ammonium hydrogen carbonate at 4°C and lyophilized. The reduced carboxyamidomethylated proteins were digested with L-1-tosylamide-2-phenylethylchloromethylketone (TPCK) bovine pancreas trypsin (EC 3.4.21.4, Sigma) with an enzyme-to-substrate ratio of 1:25 (by mass), and the mixture was incubated for 24 h at 37°C in 50 mM ammonium bicarbonate buffer (pH 8.4). The reaction was terminated by boiling for 5 min before lyophilization. PNGase F digestion was carried out in ammonium bicarbonate buffer (50 mM) for 16 h at 37°C. The reaction was terminated by lyophilization and the products were purified on C18-Sep-Pak to separate the N-glycans from the de-N-glycosylated peptides. After conditioning the C18-Sep-Pak by sequential washing with methanol (5 mL), and 5% v/v acetic acid ( $2 \times 5$  mL), the sample was loaded onto the Sep-Pak and the N-glycans were eluted with 3 mL of 5% v/v acetic acid. Peptides/O-glycopeptides were eluted with 3 mL of ACN/water (80:20; v/v) containing 0.1% v/v TFA. ACN was evaporated under a stream of nitrogen and the samples were freeze-dried.

#### 2.6 Permethylation of the glycans

Permethylation of the freeze-dried native *N*- and *O*-glycans (respectively 30 and 50%) and the desialylated glycans was performed according to the procedure developed by Ciucanu and Kerek [30]. The reaction was terminated by adding 1 mL of cold 5% v/v acetic acid followed by three extractions with 500  $\mu$ L of chloroform. The pooled chloroform phases (1.5 mL) were then washed eight times with ultra-pure water. The methylated derivatives-containing chloroform phase was finally dried under a stream of nitrogen and the extracted products were further purified on a C18 Sep-Pak. The C18 Sep-Pack was sequentially conditioned with methanol (5 mL), and water (2 × 5 mL). The derivatized glycans dissolved in methanol were applied on the cartridge, washed

with  $3 \times 5$  mL water, 2 mL of 10% v/v ACN in water and eluted with 3 mL of 80% v/v ACN in water. ACN was evaporated under a stream of nitrogen and the samples were freeze-dried.

#### 2.7 Linkage analysis

The permethylated native and desialylated N- and O-linked oligosaccharides were hydrolyzed in 300  $\mu$ L of 4 M TFA at 100°C for 4 h. After removing TFA by drying in vacuo, the permethylated compounds were then reduced at room temperature overnight by adding 200 µL of 2 M ammonia solution containing sodium borodeuteride (4 mg/mL). The reduction was terminated by adding acetic acid and borates were eliminated under a stream of nitrogen in the presence of methanol containing 5% v/v acetic acid. After adding 20 µL of pyridine and 200 µL of acetic anhydride, peracetylation was carried out at 100°C for 2 h. After evaporation under a stream of nitrogen, the partially methylated alditol acetates (PMAA) were dissolved in chloroform and the chloroform phase was washed ten times with water. This PMAA-containing phase was finally dried under a stream of nitrogen and the PMAA were dissolved in methanol before GC-MS analysis. GC separation of PMAA was performed using a Carbo Erba GC 8000 gas chromatograph fitted with a  $25 \text{ m} \times 0.32 \text{ mm}$  CP-Sil5 CB Low bleed capillary column, 0.25 µm film phase (Chrompack France, Les Ullis, France). The temperature of the Ross injector was 260°C. Samples were analyzed using a temperature programme starting by a gradient of 2°C/min from 130 to 180°C, after 2 min at 130°C, followed by a gradient of 4°C/min until 240°C. The column was coupled to a Finnigan Automass II mass spectrometer. Analyses were performed in the electron impact mode using an ionization energy of 70 eV. Quantification of the various PMAA derivatives was carried out using TIC of the MS detector in positive ion mode.

#### 2.8 MALDI-TOF-MS

MALDI-TOF-MS experiments were carried out on Voyager Elite DE-STR Pro instrument (PersSeptive Biosystem, Framingham, MA, USA) equipped with a pulsed nitrogen laser (337 nm) and a gridless delayed extraction ion source. The spectrometer was operated in positive reflectron mode by delayed extraction with an accelerating voltage of 20 kV and a pulse delay time of 200 ns and a grid voltage of 66%. All the spectra shown represent accumulated spectra obtained by 400–500 laser shots. Sample was prepared by mixing a 1  $\mu$ L aliquot (5–10 picomoles) with 1  $\mu$ L of matrix solution, on the MALDI sample plate. The matrix solution was prepared by saturating a methanol–water (1:1) with DHB (10 mg/mL).

The on-target sequential exoglycosidase digestions were performed on desalted *N*-glycans (25% aliquot), dissolved with ultra-pure water at 5–10 picomoles/ $\mu$ L. One microliter of the sample was spotted on the MALDI sample plate and reconstituted in 1  $\mu$ L of reaction buffer (50 mM ammonium formiate, pH 4.6). For enzymatic sequencing, several en-

zyme arrays, used in combination or not, were added on each spotted sample according to the following procedure: α-sialidase, 50 mU; β-galactosidase, 1.25 mU; β-*N*-acetylhexosaminidase, 150 mU; α-fucosidase, 7.7 mU. The MALDI plate was then placed in a crystallization beaker containing water, at 37°C for 6 h. The enzymatic reactions were terminated by addition of 1 µL of a matrix solution (DHB) and the samples were analyzed by MALDI-TOF-MS.

#### 3 Results and discussion

In this study, MALDI-TOF-MS protocols were developed for mass mapping of *N*- and *O*-glycan mixtures released from human serum.

#### 3.1 Structural analysis strategy

The protocol that we have developed for preparing *N*- and *O*-glycans from proteins/glycoproteins present in human serum is described in Scheme 1. All the steps for sample preparation and purification were adapted for an efficient MALDI-TOF-MS analysis. Firstly, the proteins/glycoproteins of 20  $\mu$ L of the serum were denatured and deglycosylated by enzymatic digestion overnight with PNGase F.

*N*-glycans were then purified by SPE on porous graphitized carbon columns. The *O*-glycans were released from 10  $\mu$ L of the serum by reductive elimination. The methylated derivatives of the *N*- and *O*-glycans were purified on a Sep-Pak cartridge and characterized by MALDI-TOF-MS. PNGase F-released *N*-glycans were also characterized by MALDI-TOF-MS after on-plate sequential exoglycosidase digestions and by linkage analysis. Structural assignments were based on molecular weight, susceptibility to exoglycosidase digestions and linkage data.

#### 3.2 Screening for N-glycan content

Most of the N-glycans present in human serum are sialylated. Sialylated glycans are usually more difficult to analyze using MALDI-TOF-MS compared to neutral glycans due to the potential spontaneous fragmentation via the loss of sialic acids in both the positive and the negative ion modes. The MALDI-TOF spectrum can be recorded in the linear negative ion mode, but neutral glycans are difficult to observed in the negative ion mode [31]. Particular attention was therefore paid to these sialylated glycans. A portion of the pool (30%) of N-glycans was then derivatized by permethylation for MALDI-TOF-MS. Despite the drawback of involving an additional wet chemistry step, the permethylation derivatization of oligosaccharides increases the sensitivity of the detection of molecular ions. The composition of the molecular ions as deduced from their precise m/z values, when considered in conjunction with methylation analysis data allow important structural conclusions to be drawn on picomolar amounts of components. The stability of sialic acids in



Scheme 1. Strategy dedicated to the determination of the structures of the *N*- and *O*-linked glycans from 30  $\mu$ L of the serum.

the ion source is improved and the sialylated glycans ionise as well as the neutral glycans. Therefore, both neutral and sialylated permethylated glycans can be detected in the positive ion mode with increased sensitivity. This approach also leads to predictable fragmentations which give characteristic "maps" of fragment ions at each amino sugar residue [32]. ESI and CID can be used in conjunction with permethylation to obtain detailed structural and linkage information on complex oligosaccharides [33–35].

Figure 1 shows the MALDI-TOF mass spectra profile of the permethylated PNGase F released glycans from 20 µL of one control serum (Fig. 1A), the serum from a CDG-IIa patient (Fig. 1B), a patient with a mild form of congenital disorder of glycosylation type II (CDG-II) that is caused by a deficiency in the Cog1 subunit of the complex (Fig. 1C). Permethylated glycans give  $[M + Na]^+$  species as the major ion. As shown in Fig. 1A, the MALDI-TOF mass spectrum profile of the N-glycans released by PNGase F from an healthy subject was characterized by a major ion at m/z 2792 (Neu-Ac<sub>2</sub>Hex<sub>5</sub>HexNAc<sub>4</sub>). A heterogeneous mixture of oligosaccharides was observed, affording about 20 molecular ions. An ion at m/z 2431 (NeuAc<sub>1</sub>Hex<sub>5</sub>HexNAc<sub>4</sub>) differed from the major glycan by the mass of a sialic acid residue. The ion at m/z 2966 corresponds to the major glycan structure with a fucose residue (NeuAc<sub>2</sub>Hex<sub>5</sub>HexNAc<sub>4</sub>dHex<sub>1</sub>). The structures of the other N-glycans are shown in Fig. 1A. Based on the MALDI-TOF-MS data and currently accepted models of eukaryotic N-glycan biosynthesis, the N-glycans have complex type structures and oligomannose type structures. The major molecular ions (m/z 2040, 2431, 2605, 2792, 2966) attributable to complex structures have compositions consistent with biantennary structures. The minor molecular ions at m/z 3241 (NeuAc<sub>2</sub>Hex<sub>6</sub>HexNAc<sub>5</sub>), 3416 (NeuAc<sub>2</sub>Hex<sub>6</sub>HexNAc<sub>5</sub>dHex<sub>1</sub>), 3603 (NeuAc<sub>3</sub>Hex<sub>6</sub>HexNAc<sub>5</sub>), 3777 (NeuAc<sub>3</sub>Hex<sub>6</sub>HexNAc<sub>5</sub>dHex<sub>1</sub>) correspond to *N*-glycans with triantennary structures. *N*-glycans with tetraantennary structures were also observed at m/z 4052 (NeuAc<sub>3</sub>Hex<sub>7</sub>HexNAc<sub>6</sub>), 4226 (NeuAc<sub>3</sub>Hex<sub>7</sub>HexNAc<sub>6</sub>dHex<sub>1</sub>), 4413 (NeuAc<sub>4</sub>Hex<sub>7</sub>HexNAc<sub>6</sub>), and 4587 (NeuAc<sub>4</sub>Hex<sub>7</sub>HexNAc<sub>6</sub>dHex<sub>1</sub>), and 4761 (NeuAc<sub>4</sub>Hex<sub>7</sub>HexNAc<sub>6</sub>dHex<sub>2</sub>).

The MALDI-TOF spectrum of permethylated N-glycans obtained by deglycosylation from the glycoproteins present in 20  $\mu$ L of the serum of a patient suffering from a CDG IIa type is depicted in Fig. 1B. CDG-IIa is caused by mutations in the MGAT2 gene on chromosome 14q21 that codes for UDP-GlcNAc:α-6-D-mannoside β1,2-*N*-acetylglucosaminyltransferase II (GnT II) localized in the Golgi membrane [36-39]. The MALDI-TOF spectrum was remarkably different from Fig. 1A. This spectrum revealed several abnormal glycan structures. A major ion was observed at m/z 1982 (Neu5Ac1Hex4HexNAc3). This ion corresponds to the mass of a monotruncated biantennary N-glycan lacking a terminal sialic acid, a galactose, and an N-acetyl glucosamine residue on one branch. The presence of this major ion confirmed a defect in N-acetyl-glucosaminylation. The ion at m/z 2156 corresponds to the major glycan structure with a fucose residue (NeuAc1Hex4HexNAc3dHex1). An important decrease in the relative abundance of fully sialylated biantennary glycans (m/z 2792) was also observed. The presence of this glycan indicates that the GnT II enzyme is not completely inactivated. Minor tri- and tetra-antennary structures were also present.



The MALDI-TOF spectrum of permethylated N-glycans obtained by deglycosylation from the glycoproteins present in 20 µL of the serum of a patient with a mild form of congenital disorder of glycosylation type II (CDG-II) that is caused by a deficiency in the Cog1 subunit of the complex [26] is depicted in Fig. 1C. Comparison of the MALDI-TOF spectra for the control (Fig. 1A) and the CDG-II patient revealed differences in the relative amounts of oligosaccharides and the presence of abnormal glycan structures in the patient as previously described [26]. The major ion was still observed at m/z 2792 (NeuAc<sub>2</sub>Hex<sub>5</sub>HexNAc<sub>4</sub>) but undersiallyated forms (NeuAc1Hex5HexNAc4 at m/z 2431 and Neu-Ac<sub>2</sub>Hex<sub>6</sub>HexNAc<sub>5</sub> at m/z 3241) were increased and undergalactosylated forms were observed at m/z 1866 (Hex<sub>4</sub>-HexNAc<sub>4</sub>) and m/z 2227 (NeuAc<sub>1</sub>Hex<sub>4</sub>HexNAc<sub>4</sub>). The presence of these abnormal structures confirmed a defect in both sialylation and galactosylation.

Figure 1. MALDI-TOF-MS spectra of the permethylated PNGase F released N-glycans from normal subject (A), patient suffering from CDG IIa (B), patient with a mild form of congenital disorder of glycosylation type II (CDG-II) that is caused by a deficiency in the Cog1 subunit of the complex (C). The sera (20 µL) were dried and denaturated using β-mercaptoethanol and SDS at 100°C during 20 min. After adding Nonidet P40, the Ndeglycosylation was performed using PNGase F. The PNGase F released N-glycans were purified as previously described [27]. An aliquot (30%) was permethylated. The permethylated derivatives were then analyzed in positive ion reflective mode as [M + Na]<sup>+</sup> pseudomolecular ions. Only the structures of the major N-glycans are given. A minor portion of the monofucosylated glycans carries fucose on an antenna rather than the core. Galactose (open circles); mannose (closed circles); GlcNAc (closed squares); fucose (open triangles); NeuAc (closed diamonds); GalNAc (open squares).

In order to confirm tentative assignments additional experiments are required. This is achieved by partial chemical and enzymatic degradations monitored by MALDI-TOF-MS and by linkage analysis (Scheme 1). In a first step, the glycans were desialylated using a chemical treatment in order to localize the Neu5Ac residues. After desialylation, the glycans were permethylated, purified on a Sep Pack C18, analyzed by MALDI-TOF-MS and by linkage analysis.

The MALDI-TOF-MS spectrum of the desialylated permethylated glycans of the control serum is depicted in Fig. 2A. The MALDI-TOF-MS data indicated that as expected, all the sialylated molecular ions previously described (Fig. 1A) were reduced in molecular weight consistent with the loss of two, three, or four sialic acid residues. The major molecular ion was observed at m/z 2070 (Hex<sub>5</sub>HexNAc<sub>4</sub>). The MALDI-TOF-MS spectrum of the desialylated permethylated glycans of the serum of the patient suffering from CDG type IIa is depicted in Fig. 2B. A major molecular



Figure 2. MALDI-TOF MS spectra of the permethylated PNGase F released N-glycans from normal subject (A) and patient suffering from CDG IIa (B) after chemical desialylation. The sera (20 uL) were dried and denaturated using β-mercaptoethanol and SDS at 100°C during 20 min. After adding Nonidet P40, the N-dealycosylation was performed using PNGase F. The PNGase F released N-glycans were purified as previously described [27]. N-glycans (10%) was submitted to a chemical desialylation using acetic acid and permethylated. The permethylated derivatives were then analyzed in positive ion reflective mode as [M + Na]<sup>+</sup> pseudomolecular ions. Only the structures of the major N-glycans are given. A minor portion of the monofucosylated glycans carries fucose on an antenna rather than the core. Symbols are as in Fig. 1.

ion was observed at m/z 1621 (Hex<sub>4</sub>HexNAc<sub>3</sub>). The chemical desiallyation of the *N*-glycans allows the reduction of sample heterogeneity and confirms the monosaccharidic composition of the *N*-glycans.

# 3.3 Linkage analysis of the PNGase F released glycans from glycoproteins present in human serum

Linkage analysis on the PNGase F released glycans from five control sera and the serum from a CDG-IIa patient gave the data shown in Table 1. These results are fully consistent with complex type structures being the major constituents of the *N*-glycan population.

Key features of these data are as follows. (i) 3,6-linked Man and 4-linked GlcNAc are components of the core of all N-glycans; the presence of traces of 3,4,6-linked Man indicates that minor structures with bisecting GlcNAc residues are present; (ii) the abundant 2-linked Man indicates that the majority of the complex type glycans are biantennary but low levels of 2,4-linked Man and 2,6-linked Man suggest that minor tri- and/or tetra-antennary structures are present; (iii) the abundant 6-linked Gal suggest that sialic acid residues were mainly attached to the 6-position of Gal; (iv) after desialylation, 6-linked Gal disapears and there is a concomitant increase in terminal Gal, indicating that sialic acid residues were attached to the 6-position of Gal prior to desialylation; (v) some 4,6-linked GlcNAc is present but most of the GlcNAc is 4-linked; (vi) 4,6-linked GlcNAc supports the presence of core  $\alpha_6$ -fucosylation.

Similar linkages were found in the PNGase F released glycans from glycoproteins of the patient suffering from CDG type IIa. However, differences in the relative intensities were found and new residues were also observed (Table 1). These results are fully consistent with a defect in *N*-acetyl-glucosaminylation.

#### 3.4 Sequential exoglycosidase digestions of the PNGase F released glycans' mixture

To define the anomeric configurations as well as to confirm tentative sequences, *N*-glycans released by PNGase F from one control serum and the serum from a CDG-IIa patient were subjected to on-plate treatment with an array of exoglycosidases and then analyzed by MALDI-TOF-MS (Figs. 3 and 4). The resulting mass shift for a given molecular ion is indicative of the residues removed.

After neuraminidase treatment, the MALDI-TOF-MS data indicated that as expected, all the sialylated molecular ions were reduced in molecular weight (Figs. 3A and 4A). A major molecular ion was observed at m/z 1663 (Hex<sub>5</sub>Hex-NAc<sub>4</sub>) and 1298 (Hex<sub>4</sub>HexNAc<sub>3</sub>) for the healthy subject and the patient suffering from CDG type IIa, respectively. Thus the Neu5Ac residues are in normal linkage.

After  $\beta$ -galactosidase treatment, the MALDI-TOF-MS spectrum of the *N*-glycans from the patient suffering from CDG type IIa was more heterogeneous than the spectrum of the *N*-glycans from a normal human serum (Figs. 3B and 4B). Nine molecular ions were observed in the spectrum of the *N*-glycans from normal human serum (Fig. 3B) at

 Table 1. Linkage analysis of partially methylated alditol acetates derivatives of the PNGase F-released N-glycans from sera from 5 healthy subjects (A, B, C, D and E) and one patient suffering from CDG IIa

Retention time (min)	Characteristic fragment ions ( <i>m/z</i> )	Assignment	Relative abundance					
			A	В	С	D	Е	CDGII a
15.29	115,118, 131, 162, 175	Terminal Fuc	0.05	0.05	0.06	0.04	0.07	0.09
19.55	102, 118, 129, 145, 161, 162, 205	Terminal Man	0.02	0.03	0.03	0.03	0.03	0.42
20.46 <sup>a)</sup>	102, 118, 129, 145, 161, 162, 205	Terminal Gal	0.06	0.12	0.08	0.12	0.07	0.08
23.55	129, 130, 161, 190	2-linked Man	0.50	0.72	0.66	0.71	0.50	0.35
24.46 <sup>b)</sup>	118, 129, 161, 234	3-linked Gal	0.04	0.06	0.04	0.07	0.03	0.06
26.42 <sup>b)</sup>	99, 102, 118, 129, 162, 189, 233	6-linked Gal	0.40	0.56	0.56	0.55	0.38	0.52
28.02	130, 190, 233	2,4-linked Man	0.03	0.03	0.03	0.05	0.03	0.04
29.29	129, 130, 189, 190	2,6-linked Man	0.03	0.03	0.03	0.05	0.07	0.03
29.51	118, 129, 189, 234	3,6-linked Man	0.20	0.25	0.27	0.27	0.17	0.20
31.10	118, 333	3,4,6-linked Man	0.01	0.02	0.02	0.01	0.05	0.03
32.16	117, 159, 203, 205	Terminal GlcNAc	0.06	0.05	0.04	0.05	0.05	0.05
34.33	117, 159, 233	4-linked GlcNAc	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
35.23	118, 233	4-linked HexNAc	0.02	0.01	0.01	0.03	0.02	0.01
36.46	118, 129	3,4-linked GlcNAc	0.02	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01
37.58	117, 159, 261	4,6-linked GlcNAc	0.07	0.04	0.05	0.03	0.04	0.08

The 80% (v/v) ACN fractions from Sep-Pak purifications of permethylated *N*-glycans were hydrolyzed, reduced, acetylated, and analyzed by GC-MS. **A-E** correspond to five normal total serum *N*-glycomes and **CDGIIa** to *N*-glycome of patient suffering from CDG IIa.

a) Signals more intense after chemical desial ylation of  $N\mbox{-glycans}.$ 

b) Signals not observed after chemical desialylation of *N*-glycans.

m/z 1339 (Hex<sub>3</sub>HexNAc<sub>4</sub>), 1485 (Hex<sub>3</sub>HexNAc<sub>4</sub>dHex<sub>1</sub>), 1542 (Hex<sub>3</sub>HexNAc<sub>5</sub>), 1688 (Hex<sub>3</sub>HexNAc<sub>5</sub>dHex<sub>1</sub>), 1745 (Hex<sub>3</sub>HexNAc<sub>6</sub>), 1850 (Hex<sub>4</sub>HexNAc<sub>5</sub>dHex<sub>1</sub>), and 1892 (Hex<sub>3</sub>HexNAc<sub>6</sub>dHex<sub>1</sub>). The same molecular ions were observed in the spectrum of the *N*-glycans from the patient suffering from CDG type IIa (Fig. 4B). In addition, two molecular ions at m/z 1136 (Hex<sub>3</sub>HexNAc<sub>3</sub>) and m/z 1282 (Hex<sub>3</sub>HexNAc<sub>3</sub>dHex<sub>1</sub>) were also detected. These ions correspond to the degalactosylated monotruncated biantennary *N*-glycan lacking previously a terminal sialic acid, a galactose, and a *N*-acetyl glucosamine residue on one branch (Fig. 1B). These data indicated that the components were efficiently degalactosylated by β-galactosidase from bovine testes, except for the minor ion at m/z 1850 (Hex<sub>4</sub>HexNAc<sub>5</sub>dHex<sub>1</sub>).

After  $\beta$ -*N*-acetylglucosaminidase treatment, as expected, two major molecular ions were observed at m/z 1079 (Hex<sub>3</sub>. HexNAc<sub>3</sub>dHex<sub>1</sub>) and 933 (Hex<sub>3</sub>HexNAc<sub>2</sub>) (Figs. 3C and 4C). These ions are consistent with trimannosyl core with and without core fucosylation, respectively. After  $\alpha$ -fucosidase treatment, the molecular ion at m/z 1079 (Hex<sub>3</sub>HexNAc<sub>3</sub>d-Hex<sub>1</sub>) was abolished (Figs. 3D and 4D). These MALDI data indicated that, as expected, the complex-type glycans were fully trimmed to Hex<sub>3</sub>HexNAc<sub>2</sub>, while putative high-mannose structures were unaffected.

#### 3.5 Screening for O-glycan content

Reductive  $\beta$ -elimination on 10  $\mu$ L of the serum was carried out in order to release the *O*-glycans. After reductive  $\beta$ -elim-

ination, Dowex purification, and borate removal, the O-glycans were permethylated, purified on a Sep-Pak C18, and analyzed by MALDI-TOF-MS (Fig. 5). Data from MALDI-TOF-MS analyses of permethylated O-glycans released from the glycoproteins of the control serum and of the serum from the patient suffering from CDG type IIa are shown in Figs. 5A and B respectively. As expected, no significant differences were observed between the MALDI-TOF-MS analyses of permethylated O-glycans released from the glycoproteins of the control serum and of the serum from the patient suffering from CDG type IIa. Five molecular ions were observed at *m*/*z* 534, 895, 1256, 1344, and 1706. We analyzed 20 different serum samples from healthy personns and these five molecular ions were present in all the 20 samples (data not shown). These ions correspond to compositions Hex1. HexNAcitol (m/z 534), Neu5Ac1Hex1HexNAcitol (m/z 895), Neu5Ac<sub>2</sub>Hex<sub>1</sub>HexNAcitol (m/z1256), Neu5Ac<sub>1</sub>HexNAc<sub>1</sub>-Hex<sub>2</sub>HexNAcitol (m/z1344), and Neu5Ac<sub>2</sub>HexNAc<sub>1</sub>Hex<sub>2</sub>. HexNAcitol (m/z 1706). No fucosylated O-glycans were observed. The major O-glycans Neu5Ac1Hex1HexNAcitol and Neu5Ac2Hex1HexNAcitol are consistent with sialylated and bisialylated T-antigen structures (Neu5Aca2-3Galß1-3GalNAc-ol and Neu5Aca2-3GalB1-3(Neu5Aca2-6)GalNAcol). These glycans are present in many glycoproteins including glycophorin, plasminogen, and erythropoietin. The structure Galβ1-3(Neu5Acα2-6)GalNAc-ol cannot be excluded. Other molecular ions were also observed on these spectra and corresponded to N-glycans (Figs. 5A and B). It is particularly interesting to note that the major released



Figure 3. MALDI-TOF-MS spectra of PNGase F released N-glycans from the serum of control after treatment with  $\alpha$ -sialidase (A), after treatment with  $\alpha$ -sialidase and  $\beta$ -galactosidase (B), after treatment with  $\alpha$ -sialidase,  $\beta$ -galactosidase, and  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidase (C), and after treatment with  $\alpha$ -sialidase,  $\beta$ galactosidase, β-N-acetylhexosaminidase, and  $\alpha$ -fucosidase (D). After purification on a nonporous graphitized carbon SPE cartridge, the N-glycans were analyzed in positive ion reflective mode after on-target exoglycosidase digestions, as pseudomolecular  $[M + Na]^{+}$ ions. Symbols are as in Fig. 1.

*N*-glycan is at m/z 2792 (NeuAc<sub>2</sub>Hex<sub>5</sub>HexNAc<sub>4</sub>) for control and at m/z 1982 (Neu5Ac<sub>1</sub>Hex<sub>4</sub>HexNAc<sub>3</sub>) for the patient suffering from CDG IIa. These results are fully consistent with the MALDI-TOF mass spectra profile of the permethylated PNGase F released glycans from 20 µL of the control serum (Fig. 1A) and the serum from the CDG-IIa patient (Fig. 1B).

Therefore, reductive  $\beta$ -elimination on 10  $\mu$ L of the serum can pinpoint the defective step(s) in the processing pathway of *N*-glycans.

Data from MALDI-TOF-MS analysis of permethylated *O*-glycans released from the glycoproteins of the serum from a patient with a mild form of congenital disorder of glycosyla-

100

1298

A





Figure 4. MALDI-TOF-MS spectra of PNGase F released N-glycans from the serum of patient suffering from CDG IIa after treatment with  $\alpha$ -sialidase (A), after treatment with  $\alpha$ -sialidase and  $\beta$ -galactosidase (B), after treatment with  $\alpha$ -sialidase,  $\beta$ galactosidase and *β-N*-acetylhexosaminidase (C), and after treatment with  $\alpha$ -sialidase,  $\beta$ galactosidase, β-N-acetylhexosaminidase and  $\alpha$ -fucosidase (D). After purification on a nonporous graphitized carbon SPE cartridge, the N-glycans were analyzed in positive ion reflective mode after on-target exoglycosidase digestions, as  $[M + Na]^{+}$ pseudomolecular ions. Symbols are as in Fig. 1.

tion type II (CDG-II) that is caused by a deficiency in the Cog1 subunit of the complex are shown in Fig. 5C. The IEF of the patient plasma ApoC-III showed an abnormal profile indicating that there is a partial *O*-glycan sialylation defect in this patient [26]. Comparison of the MALDI-TOF spectra for the control (Fig. 5A) and this patients revealed differences in the relative amounts of *O*-glycans at m/z 534 (Hex<sub>1</sub>HexN-Acitol) and 1256 (Neu5Ac<sub>2</sub>Hex<sub>1</sub>HexNAcitol). The ion at

m/z 1256 for these patients was decreased whereas the ion at m/z 534 was increased. These results were fully consistent with the abnormal profile for plasma apoC-III and confirmed an *O*-glycan sialylation defect in these patients. *N*-glycans were also released using reductive  $\beta$ -elimination. The major released *N*-glycans for both patients were at m/z 2792 (NeuAc<sub>2</sub>Hex<sub>5</sub>HexNAc<sub>4</sub>), 2431 (NeuAc<sub>1</sub>Hex<sub>5</sub>HexNAc<sub>4</sub>), and confirmed a defect in *N*-glycan sialylation.

Glycoproteomics



Figure 5. MALDI-TOF-MS spectra of the permethylated O-glycans from sera of control (A), patient suffering from CDG IIa (B), patient with a mild form of congenital disorder of glycosylation type II (CDG-II) that is caused by a deficiency in the Cog1 subunit of the complex (C). Ten microliters of the serum was subjected to reductive elimination. After Dowex purification, and borate removal, 50% of the O-glycans were permethylated, purified on a Sep-Pak C18, and analyzed by MALDI-TOF-MS. The permethylated derivatives were analyzed in positive ion reflective mode, as  $[M + Na]^+$ . Symbols are as in Fig. 1.

In order to confirm the presence of these major *O*-glycans in the human serum, reduced/carboxymethylated proteins/glycoproteins present in 20  $\mu$ L of a control serum were first digested with trypsin. Glycans were then released from the resulting peptides/glycopeptides by digestion with PNGase F. PNGase F released oligosaccharides were separated from peptides and glycopeptides using a C18 Sep-Pak. The O-glycans were released from the glycopeptides by reductive elimination, permethylated with iodomethane, purified on a Sep-Pak cartridge, and analyzed by MALDI-TOF-MS (Fig. 6A). Only five molecular ions were observed at *m*/*z* 534, 895, 1256, 1344, and 1706. These *O*-glycans were also permethylated with deuterated iodomethane (CD<sub>3</sub>I). The MALDI-TOF-MS spectrum of the deuteropermethylated *O*-glycans from the glycoproteins of the control serum is depicted in Fig. 6B. Five molecular ions were observed at m/z 561 (Hex<sub>1</sub>HexNAcitol), 938 (Neu5Ac<sub>1</sub>Hex<sub>1</sub>HexNAcitol), 1314 (Neu5Ac<sub>2</sub>Hex<sub>1</sub>HexNAcitol), 1405 (Neu5Ac<sub>1</sub>HexNAc<sub>1</sub>-Hex<sub>2</sub>HexNAcitol), and 1781 (Neu5Ac<sub>2</sub>HexNAc<sub>1</sub>Hex<sub>2</sub>HexNAcitol). Besides, an aliquot of the *O*-glycans was desialylated using a chemical treatment, permethylated with iodomethane, purified on a Sep Pak C18, and analyzed by MALDI-TOF-MS (Fig. 6C). The MALDI-TOF-MS data indicated that as expected, the five sialylated molecular ions previously described (Fig. 6A) were reduced in molecular weight consistent with the loss of one, or two sialic acid residues. Two molecular ions were observed at m/z 534 (Hex<sub>1</sub>HexN-Acitol), and 983 (HexNAc<sub>1</sub>Hex<sub>2</sub>HexNAcitol). The chemical desialylation of the *O*-glycans.


Figure 6. MALDI-TOF-MS spectra of *O*-glycans from sera of control permethylated using ICH3 before (A) and after desialylation (C), and ICD3 (B). The serum (20  $\mu$ L) was subjected to reductive elimination after PNGase F digestion as described in Section 2. The permethylated derivatives were analyzed in positive ion reflective mode, as [M + Na]<sup>+</sup>. Symbols are as in Fig. 1.

#### 4 Concluding remarks

The purpose of this study was to develop a high-throughput mass spectrometric screening method that allows analysis of *N*- and *O*-glycosylation modifications at congenital stage or in diseases. The protocol described in this paper is simple, rapid, and can provide total serum sialylated *N*-glycome and sialylated *O*-glycome in 4 days. Information about the sialylated *N*-glycome can be obtained in 3 days.

MS in combination with modern separation methodologies is one of the most powerful and versatile techniques for the structural analysis of carbohydrates [40]. It provides many advantages over traditional analytical methods, such as low sample consumption and high sensitivity. MALDI-TOF-MS being the most sensitive of the soft ionization techniques in MS, we used this technique to characterize the *N*-glycans released by PNGase F and the *O*-glycans released by reductive elimination from total serum glycoproteins. Only 30  $\mu$ L

without requiring the prior purification of a specific glycoprotein. Since a small volume of human serum is needed, the protocol is fully suitable for the search of *N*- and *O*-glycosylation modifications at congenital stage or in acquired diseases. Furthermore, it is important that a small volume of the serum is needed to perform these experiments since analysis of glycosylation modifications is usually necessary for children.

of human serum was used to isolate the N- and O-glycans

A portion of each pool of isolated *N*- and *O*-glycans is then derivatized by permethylation before being analyzed by MALDI-TOF-MS. These initial screening experiments provide information on glycan compositions and assist in deciding whether or not to investigate glycan structure in more detail. If abnormal ions are observed in the *N*- and/or *O*-glycan MALDI-TOF-MS profiles, then structural analysis on the remaining pool of glycans can be achieved by linkage analysis, chemical treatments, and sequential exoglycosidase digestions. This approach was applied to a patient suffering from CDG type IIa. The MALDI-TOF-MS spectrum of the *N*-glycans from this patient revealed the presence of several "abnormal" glycan structures in human serum (Fig. 1B). The elucidation of these abnormal glycan structures confirmed a defect in *N*-acetyl-glucosaminylation. Besides, this approach indicates that the GnT II enzyme is not completely inactivated since minor tri- and tetra-antennary structures were also observed in the MALDI-TOF-MS spectrum. The defective transferase in CDG-IIa is not required for the biosynthesis of the *O*-glycans. Therefore, the finding of normal MALDI-TOF-MS spectrum of permethylated *O*-glycans released from the glycoproteins of the serum from the patient suffering from CDG type IIa is as expected.

This approach was also applied to a patient with a mild form of congenital disorder of glycosylation type II (CDG-II) that is caused by a deficiency in the Cog1 subunit of the complex. The MALDI-TOF-MS spectrum of the *N*-glycans from the patient's serum revealed a defect in sialylation and galactosylation as previously described [26]. In addition, mass spectrometric analysis of the structures of the O-linked glycans released from glycoproteins from the patient's serum confirmed a decrease in sialic acids on mucin type *O*-glycans, indicating a combined defect in *N*- and *O*-glycosylation.

This approach constitutes a significant improvement in the diagnosis of defects in glycan biosynthesis. A mass spectrometric analysis of glycans in elucidating the pathogenesis of CDG type IIx has already been proposed by Mills et al. [41]. However, the methodology can only pinpoint the defective step(s) in the processing pathway of *N*-glycans. In addition, the approach proposed by Mills et al. does not provide information about the position of linkages of monosaccharides within an oligosaccharide. The mass spectrometric approach that we propose can be used to screen N- and O-glycosylation modifications. Furthermore, since the elucidation of all interglycosidic linkages is usually performed using a methylation approach, MALDI-TOF-MS analysis of permethylated glycans can represent the first step before a GC/MS analysis of chemically modified monosaccharides that are derived from methylation, hydrolysis, reduction, and acetylation of glycans.

Since the O-glycans detected in 10  $\mu$ L of the serum correspond to mucin type O-glycans, this approach cannot provide any information about other O-glycans such as glycosaminoglycans, O-mannosyl glycans which are less common, and present on a limited number of glycoproteins in the brain, nerves, and skeletal muscle. In addition, it is important to note that this strategy can only detect glycan modifications if several serum glycoproteins are modified.

Transferrin IEF (TIEF) is generally used as a screening for defects in the biosynthesis of *N*-linked glycans [42]. A typical CDG type 1 TIEF is characterized by increased amounts of asialo and disialo transferring. CDG types IIa, IId, and IIe result also in abnormal TIEF profile. However, CDG types IIb, IIc, and IIf give normal TIEF profiles. IEF of apoliprotein C-III (apoC-III) has recently been described as a screening assay for defects in the biosynthesis of core 1 *O*-glycans [23]. Recently, the combination of the TIEF, apoC-III IEF, and apoC-III SDS-PAGE was successfully used to subdivide CDG type II patients into six biochemically distinct groups. This subdivision limits the options for the position of the primary defect [24]. Although IEF is very useful for initial screening of CDG, it does not identify the abnormal glycans on the serum glycoproteins. Thus, the reported methodology is complementary to IEF of the serum transferrin and apoliprotein C-III in the diagnosis of CDG IIx patients. We hope that this approach will help to elucidate the defective steps in the processing pathway of *N*- and *O*-glycans during diseases such as CDG.

This research was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (Unité Mixte de Recherche CNRS/USTL 8576; Director: Dr. Jean-Claude Michalski), the Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur. The Mass Spectrometry facility used in this study was funded by the European Community (FEDER), the Région Nord-Pas de Calais (France) and the Université des Sciences et Technologies de Lille. The authors are extremely grateful to Dr. Gert Matthijs for providing the serum from the patient affected by a mild form of congenital disorder related to type II glycosylation (CDG-II), caused by a deficiency in the Cog1 subunit of the complex [26].

#### 5 References

- Jones, J., Krag, S. S., Betenbaugh, M. J., Biochim. Biophys. Acta 2005, 1726, 121–137.
- [2] Hounsell, E. F., Davies, M. J., Renouf, D. V., *Glycoconj. J.* 1996, 13, 19–26.
- [3] Freeze, H. H., Aebi, M., Curr. Opin. Struct. Biol. 2005, 15, 490– 498.
- [4] Yamashita, K., Ideo, H., Ohkura, T., Fukushima, K. et al., J. Biol. Chem. 1993, 268, 5783–5789.
- [5] Briones, P., Vilaseca, M. A., Garcia-Silva, M. T., Pineda, M. *et al.*, *Eur. J. Paediatr. Neurol.* 2001, *5*, 127–131.
- [6] Helander, A., Eriksson, G., Stibler, H., Jeppsson, J. O., Clin. Chem. 2001, 47, 1225–1233.
- [7] Yamashita, K., Ohkura, T., Ideo, H., Ohno, K., Kanai, M., J. Biochem. 1993, 114, 766–769.
- [8] Lacey, J. M., Bergen, H. R., Magera, M. J., Naylor, S., O'Brien, J. F., *Clin. Chem.* 2001, *47*, 513–518.
- [9] Kleinert, P., Küster, T., Durka, S., Ballhausen, D. et al., Clin. Chem. Lab. Med. 2003, 41, 1580–1588.
- [10] Nakanishi, T., Okamoto, N., Tanaka, K., Shimizu, A. Biol. Mass Spectrom. 1994, 23, 230–233.
- [11] Carchon, H. A., Chevigne, R., Falmagne, J. B., Jaeken, J., *Clin. Chem.* 2004, *50*, 101–111.
- [12] Yuasa, I., Ohno, K., Hashimoto, K., Iijima, K. et al., Brain Dev. 1995, 17, 13–19.
- [13] Fang, J., Peters, V., Assmann, B., Korner, C., Hoffmann, G. F., J. Inherit. Metab. Dis. 2004, 27, 581–590.

Proteomics 2007, 7, 1800-1813

- [14] Mills, P. B., Mills, K., Mian, N., Winchester, B. G., Clayton, P. T., J. Inherit. Metab. Dis. 2003, 26, 119–134.
- [15] Butler, M., Quelhas, D., Critchley, A. J., Carchon, H. *et al.*, *Glycobiology* 2003, *13*, 601–622.
- [16] Buck, C. A., Glick, M. C., Warren, L., Science 1971, 172, 169– 171.
- [17] Parekh, R. B., Dwek, R. A., Sutton, B. J., Fernandes, D. L. et al., Nature 1985, 316, 452–457.
- [18] Flogel, M., Lauc, G., Gornik, I., Macek, B., Clin. Chem. Lab. Med. 1998, 36, 99–102.
- [19] Callewaert, N., Van Vlierberghe, H., Van Hecke, A., Laroy, W. et al., Nat. Med. 2004, 10, 429–434.
- [20] Paradis, V., J. Hepatol. 2005, 43, 913-914.
- [21] Topaz, O., Shurman, D. L., Bergman, R., Indelman, M. et al., Nat. Genet. 2004, 36, 579–581.
- [22] Okajima, T., Yoshida, K., Kondo, T., Furukawa, K., J. Biol. Chem. 1999, 274, 22915–22918.
- [23] Wopereis, S., Grunewald, S., Morava, E., Penzien, J. M. et al., Clin. Chem. 2003, 49, 1839–1845.
- [24] Wopereis, S., Morava, E., Grunewald, S., Adamowicz, M. et al., Glycobiology 2005, 15, 1312–1319.
- [25] Cormier-Daire, V., Amiel, J., Vuillaumier-Barrot, S., Tan, J. *et al., J. Med Genet.* 2000, *37*, 866–874.
- [26] Foulquier, F., Vasile, E., Schollen, E., Callewaert, N. et al., Proc. Natl. Acad Sci. 2006, 103, 3764–3769.
- [27] Morelle, W., Flahaut, C., Michalski, J. C., Louvet, A. et al., *Glycobiology* 2006, *16*, 281–293.

- [28] Carlson, D. M., *J. Biol. Chem.* 1968, *243*, 616–626.
- [29] Varki, A., Diaz, S., Anal. Biochem. 1984, 137, 236–247.
- [30] Ciucanu, I., Kerek, F., Carbohydr. Res. 1984, 131, 209-217.
- [31] Papac, D. I., Wong, A., Jones, A. J., Anal. Chem. 1996, 15, 3215–3223.
- [32] Dell, A., Reason, A. J., Khoo, K. H., Panico, M. et al., Methods Enzymol. 1994, 230, 108–132.
- [33] Sheeley, D. M., Reinhold, V. N., Anal. Chem. 1998, 70, 3053– 3059.
- [34] Weiskopf, A. S., Vouros, P., Harvey, D. J. Rapid Commun. Mass Spectrom. 1997, 11, 1493–1504.
- [35] Morelle, W., Faid, V., Michalski, J. C., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2004, *18*, 2451–2464.
- [36] Jaeken, J., Schachter, H., Carchon, H., De Cock, P. et al., Arch. Dis. Child 1994, 71, 123–127.
- [37] Tan, J., Dunn, J., Jaeken, J., Schachter, H., Am. J. Human Genet. 1996, 59, 810–817.
- [38] Schachter, H., Jaeken, J., Biochim. Biophys. Acta 1999, 1455, 179–192.
- [39] Grünewald, S., Matthijs, G., Jaeken, J., *Pediatr. Res.* 2002, 52, 618–624.
- [40] Morelle, W., Canis, K., Chirat, F., Faid, V., Michalski, J. C., Proteomics 2006, 6, 3993–4015.
- [41] Mills, P., Mills, K., Clayton, P., Johnson, A. et al., Biochem. J. 2001, 359, 249–254.
- [42] Jaecken, J., J. Inherit. Metab. Dis. 2003, 26, 99-118.

## **3- DISCUSSION**

L'objectif de cette étude a été de développer une approche glycobioanalytique globale de la N- et de la O-glycosylation des protéines sériques totales à haut débit, basée sur l'utilisation du MALDI-TOF-MS, par la microanalyse de 30 µL de sérum sanguin, pour le dépistage rapide des CDG. La stratégie décrite dans cette étude permet d'explorer rapidement le Nglycome et le O-glycome des glycoprotéines sériques totales, respectivement en trois et quatre jours, en utilisant un minimum d'échantillon biologique (30 µL) qui ne nécessite aucune étape de purification préalable. L'ionisation MALDI est la technique la plus sensible, de toutes les techniques d'ionisation douce, et, de fait, devient incontournable dans les analyses glycomiques de glycoprotéines d'intérêt biologique et clinique. Couplée à un analyseur TOF, il offre la possibilité de déterminer, avec une importante précision en masse et une grande résolution, la masse moléculaire et la composition en monosaccharides, en termes de NeuAc, d'HexNAc, d'Hex et de dHex, permettant ainsi l'identification partielle des N-glycannes et des O-glycannes neutres et sialylés. De plus, l'intensité du signal des ions pseudomoléculaires peut être utilisée pour une quantification relative des glycannes perméthylés. Le N-glycome sérique est dominé par un N-glycanne biantenné ( $\beta$ 1-4)-bigalactosylé ( $\alpha$ 2-6)-bisialylé, accompagné par une vingtaine de structures dérivées des nombreuses possibilités de substitution d'un N-glycanne biantenné ( $\beta$ 1-4)-bigalactosylé par des résidus de NeuAc en ( $\alpha$ 2-3/6), par un résidu de GlcNAc intercalaire, par des résidus de Fuc en ( $\alpha$ 1-6) et ( $\alpha$ 1-3) sur le résidu de GlcNAc proximal et sur les résidus de GlcNAc périphériques, respectivement. Couplée à des digestions exoglycosidasiques séquentielles sur cible MALDI, cette approche permet de caractériser la séquence primaire des N-glycannes. Le O-glycome sérique, quant à lui, est dominé par un O-glycanne à noyau 1 (α2-3)-sialylé, accompagné par deux Oglycannes à noyau 1 a- et bisialylés et deux O-glycannes à noyau 1 dont le résidu de Gal est prolongé par une unité LacNAc de type II et /ou à noyau 2 mono- et bisialylés.

L'analyse structurale des glycannes de glycoprotéines sériques, par MALDI-TOF-MS, a déjà été proposée pour l'élucidation de la voie métabolique bloquante, au cours de CDG-IIx (Mills *et al.*, 2003). Cependant, elle ne permet pas l'exploration de la O-glycosylation des protéines sériques, ni la quantification relative des N- et O-glycannes neutres et sialylés, sous leur forme native.

Cette approche a été appliquée à la microanalyse du sérum de patients atteints d'une déficience en GlcNAc T II (CDG-IIa). Le profilage N-glycomique a permis de mettre en

évidence plusieurs glycobiomarqueurs d'intérêt, caractérisés par l'absence d'une antenne ( $\beta$ 1-2)-N-acétylglucosaminyl, confirmant une déficience en GlcNAc T II. La présence de structures tri- et tétraantennées mineures confirment l'inactivation partielle de l'enzyme. Le O-glycome sérique n'est, quant à lui, pas affecté, puisque la GlcNAc T II n'intervient que dans la synthèse des N-glycannes de type complexe. La méthodologie a également été validée par la microanalyse de la N- et O-glycosylation des protéines sériques totales d'un patient atteint d'une déficience en protéine COG 1 (CDG-IIg). Le profilage N-glycomique a permis de mettre en évidence de profondes altérations de la sialylation et de la galactosylation des Nglycannes, comme cela a été décrit par Foulquier *et al.* (2006). L'hyposialylation des Oglycannes a également été confirmée par le profilage O-glycomique. Ces perturbations, affectant des voies métaboliques différentes, confirment bien une anomalie dans le trafic et la compartimentation intracellulaire des effecteurs de la N- et de la O-glycosylation.

Cette approche s'avère très efficace pour l'exploration rapide de la N- et O-glycosylation des protéines sériques et l'élucidation des voies métaboliques déficientes au cours des CDG-Ix et -IIx. Cette méthode peut également permettre l'identification de glycobiomarqueurs d'intérêt, pouvant être utilisés comme de précieux indicateurs diagnostiques et/ou pronostiques d'un certain nombre de processus pathologiques acquis, associés à des modifications des profils de la glycosylation, tels que les cancers, certaines pathologies inflammatoires chroniques ou encore la cirrhose hépatique.

# ANNEXE

## **Chapter 1**

## Analysis of *N*- and *O*-Linked Glycans from Glycoproteins Using MALDI-TOF Mass Spectrometry

Willy Morelle, Valegh Faid, Frédéric Chirat, and Jean-Claude Michalski

## Summary

Glycosylation represents the most common of all known protein post-translational modifications. Carbohydrates can modulate the biological functions of a glycoprotein, protect a protein against hydrolysis via protease activity, and reduce or prevent aggregation of a protein. The determination of the carbohydrate structure and function in glycoproteins remains one of the most challenging tasks given to biochemists, as these molecules can exhibit complex branched structures that can differ in linkage and in the level of branching. In this review, we will present the approach followed in our laboratory for the elucidation of N- and O-glycan chains of glycoproteins. First, reduced/ carboxamidomethylated glycoproteins are digested with a protease or a chemical reagent. N-Glycans are then released from the resulting peptides/glycopeptides via digestion with peptide N-glycosidase F (PNGase F). Oligosaccharides released by PNGase F are separated from peptides and glycopeptides using a C18 Sep-Pak, and their methylated derivatives are characterized by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). O-Glycans are released by reductive elimination, which are permethylated, purified on a Sep-Pak C18 cartridge, and analyzed with MALDI-TOF-MS. Finally, to confirm the structures N-glycans released by PNGase F are characterized using MALDI-TOF-MS following on-plate sequential exoglycosidase digestions. The clean-up procedures of native and permethylated oligosaccharides for an efficient MALDI-TOF-MS analysis will also be described. This strategy was applied to calf fetuin and glycoproteins present in human serum.

Key words: Mass spectrometry, Glycomics, Structure analysis, Glycoproteins, Glycans.

## 1. Introduction

The glycosylation process is the covalent attachment of oligosaccharide chains on the protein backbone and is considered as the most common post-translational modification of proteins. There are two main types of protein glycosylation. The first

Nicolle H. Packer and Niclas G. Karlsson (eds.), Methods in Molecular Biology, Glycomics: Methods and Protocols, vol. 534 © Humana Press, a part of Springer Science + Business Media, LLC 2009 DOI: 10.1007/978-1-59745-022-5\_1

one, called O-glycosylation, corresponds to the attachment of an oligosaccharide chain to the oxygen of a hydroxylated amino acid, more commonly Ser or Thr (1). The second one, called N-glycosylation, corresponds to the attachment of an oligosaccharide chain via the amide group of an Asn residue present in the tripeptide consensus sequence – Asn-X-Thr/Ser (where X can be any amino acid except Pro) (2). Each glycosylated site may contain many different glycan structures. For example, more than 100 different glycan structures have been identified on a single glycosylation site of the CD59 glycoprotein (microheterogeneity) (3). These glycan chains play key functions in biological processes, and the challenge of glycobiologists is to establish the structure/function relationship for each glycan chain. Protocols for the structural analysis of the glycan chains of glycoproteins usually involve, as a first step, the release of the carbohydrate chains from the protein backbone.

Both chemical and enzymatic methods can be used for the release of N-glycans. Anhydrous hydrazine can release unreduced N-linked glycans from glycoproteins (4). This chemical release suffers from several major disadvantages. First, as peptide bonds are destroyed, information relating to the protein is lost. Second, the acyl groups are cleaved from the N-acylamino sugars and sialic acids, calling for a reacetylation step, assuming that the sialic acid residues were originally acetylated. Third, the reacetylation step can also add a small amount of O-acetyl substitution. For these reasons, it is often desirable to perform glycan release under mild conditions using an enzyme. Several enzymes are commercially available and the two most popular ones are PNGase F and endoglycosidase H (Endo H). The first one cleaves the intact glycan chain as glycosylamine, which is readily converted into reducing glycan. With few exceptions, PNGase F releases practically all protein-bound N-linked carbohydrates except those with fucose attached to the 3 position of the Asn-linked GlcNAc residue. Their relevant glycoproteins are commonly found in plants. Endo H is more specific than PNGase F and cleaves the glycosidic bonds between the two GlcNAc residues of the chitobiose core of oligomannose and hybrid-type glycans. It is inactive on complex-type glycans.

The release of O-glycan chains can be achieved using chemical or enzymatic methods. However, enzymatic methods are restricted by the few enzymes available and their limited substrate specificities (5,6). A generic enzyme that cleaves all O-linked sugar structures from any protein is missing. For these reasons, O-glycans of glycoproteins are usually released using chemical reagents. Anhydrous hydrazine can release unreduced O-linked glycans. The release of O-linked glycans occurs with lower temperature dependence than the release of N-linked glycans are clustered in short regions of the protein. Alkaline  $\beta$ -elimination is the most commonly used chemical cleavage method for the release of *O*-glycans. Among the different protocols described (7–9), the protocol suggested by Carlson is considered as the most reliable method for the purpose (10). Sugars O-glycosidically linked to serine or threonine residues are released from *O*-glycopeptides or proteins in the reduced form containing GalNAc-ol by alkaline  $\beta$ -elimination in the presence of high concentrations of sodium borohydride, which prevents "peeling" of the released oligosaccharides by reducing the terminal GalNAc residues to its alditol.

After being released, glycans are subjected to structural analysis. Mass spectrometry has become one of the most powerful and versatile techniques for the structural analysis of glycans (11, 12). Mass spectrometry provides many advantages over traditional analytical methods, such as low sample consumption and high sensitivity. MALDI-TOF-MS is unique in its capacity to analyze complex mixtures, producing spectra uncomplicated by multiple charging. Besides, MALDI-TOF-MS provides significant tolerance against contaminants such as salts (13) or common buffers (14), and allows fast and easy sample preparation. For these reasons, MALDI-TOF-MS is one of the most popular techniques for glycan analysis.

In a MALDI experiment, the sample is cocrystallized with a 1,000-fold excess of a low molecular weight matrix which absorbs at the wavelength of the laser. The energy of the laser is first absorbed by the matrix molecules. Stimulated matrix molecules transfer their excess energy to the sample molecules, which become ionized. For this reason, MALDI is a soft ionization method that produces predominantly molecular ions from the released glycans with little or no fragmentation. Consequently, MALDI-TOF-MS is the pre-eminent technique for screening complex mixtures of glycans from biological extracts, thereby revealing the types of glycans present.

The most common matrix for the analysis of glycans is 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB). Native N- and/or O-glycans generate  $[M + Na]^+$  species as the major ions, often accompanied by minor ions  $[M + K]^+$ . The different m/z peaks observed on the mass spectrum provide information on the glycan composition in terms of Hex, dHex, HexNAc, and NeuAc. In some cases, if we take into account the rules of N- and O-glycans biosynthesis, it is also possible to deduce the glycan structure. **Table 1** lists the masses of the common monosaccharides found in N- and O-glycans. Sialylated glycans are more difficult to analyze since they can lose a significant amount of sialic acid either in the source or after ion extraction from the ion source. Moreover, sialylated ions can give a mixture of cation adducts such as  $[M + Na]^+$ ,  $[M + K]^+$ ,  $[M - nH + (n + 1)Na]^+$ , and  $[M - nH + (n + 1)K]^+$ , making the interpretation of spectra more difficult. In order to stabilize

	Native		Permethylated	
Monosaccharides	Accurate mass	Average mass	Accurate mass	Average mass
Pentose	132.042	132.116	160.074	160.170
Deoxyhexose	146.078	146.143	174.089	174.197
Hexose	162.053	162.142	204.099	204.223
N-Acetylhexosamine	203.079	203.179	245.126	245.275
Hexuronic acid	176.032	176.126	218.079	218.206
N-Acetyl-neuraminic acid	291.095	291.258	361.173	361.392
N-Glycolyl-neuraminic acid	307.090	307.257	391.184	391.418

# Table 1Residue masses of common monosaccharides

sialic acid residues, several chemical treatments such as methyl esterification of the carboxyl group of sialic acid residues (15) or amidation (16) have been suggested. In our lab, we have chosen to stabilize sialylated oligosaccharides using permethylation. This derivatization, which consists in converting all hydroxyl groups into methoxy groups, and carboxyl groups into methyl ester, allows the simultaneous analysis of neutral and sialylated oligosaccharides in the positive ion mode. In the procedure developed by Ciucanu and Kerek, which we applied, this conversion is made in two steps (17). In the first one, alcohols are transformed into alcoholate ions in the presence of sodium hydroxide in dimethylsulfoxide (DMSO). In the second step, alcoholates are methylated by methyl iodide. This approach offers several advantages. Permethylated oligosaccharides are detected with higher sensitivity, compared with their native forms. Besides, since the full structural analysis of a glycan includes the elucidation of all interglycosidic linkages, it is possible to complete the MALDI-TOF MS analysis by a gas chromatography/mass spectrometry analysis of partially acetylated and methylated monosaccharides (18).

In this review, we will describe the procedure we used in our laboratory to study the *N*- and *O*-glycan chains of a glycoprotein. Briefly, after glycoprotein proteolysis, *N*- and *O*-glycopeptides are first submitted to the PNGase F digestion to release the *N*-glycan chains. *O*-glycopeptides are subsequently treated in an alkali reductive medium to free *O*-glycan chains. Aliquots of *N*- and *O*-glycan chains are permethylated and analyzed using MALDI-TOF MS. Their primary sequence as well as the anomeric configuration is confirmed by on-plate sequential exoglycosidase digestions of the

native oligosaccharide chains. As an illustration, this methodology has been applied to the N- and O-glycoprofiling of calf fetuin (200  $\mu g)$  and to glycoproteins isolated from 20  $\mu L$  of normal human serum.

## 2. Materials

2.1. Reduction and Carboxymethylation of Glycoproteins	<ol> <li>Denaturing buffer. 0.6 M Tris-HCl, 6 M guanidinium chloride, pH 8.4. Degas for 30 min prior use.</li> <li>Reduction buffer (10×). 500 mM dithiothreitol (DDT) solution in denaturing buffer.</li> <li>Alkylating buffer (10×). 3.0 M iodoacetamide solution in denaturing buffer. This solution must be kept in the dark.</li> </ol>		
2.2. Dialysis	Spectra/Por regenerated cellulose membrane No.1 (cut-off 6,000– 8,000 Da). The dialysis is carried out against a 50 mM ammonium hydrogen carbonate solution containing 10 mM ethylenediami- netetraacetic acid (EDTA) ( <i>see</i> <b>Note 1</b> ), except for the last bath which is a 50 mM ammonium hydrogen carbonate solution.		
2.3. Trypsin Digestion	1. Trypsin (Sigma, St. Louis, MO).		
of Glycoproteins	2. Trypsin buffer. 50 mM ammonium hydrogen carbonate. Adjust to pH 8.4 with $10\%$ (v/v) ammonia solution.		
	3. <i>Trypsin solution</i> . 10 mg/mL trypsin solution in the trypsin buffer just before the experiment.		
2.4. PNGase F Digestion	<ol> <li>Recombinant peptidyl-<i>N</i>-glycosidase F(PNGase F; EC 3.5.1.52) from <i>Escherichia coli</i> (Roche, Mannheim, Germany) 1 U/μL in water (stability: several months at 4°C) (<i>see</i> Note 2).</li> </ol>		
	2. PNGase F buffer. 50 mM ammonium hydrogen carbonate. Adjust to pH 8.4 with $10\% (v/v)$ ammonia solution.		
2.5. Clean-Up Proce- dures of the Released	1. Methanol, acetic acid, acetonitrile, and trifluoroacetic acid (TFA) of the highest purity available.		
N-Glycans	2. Sep-Pak classic C18 cartridges (Waters, Milford, MA), and 150 mg of nonporous graphitized carbon columns (Alltech, Deerfield, IL).		
	3. <i>Equilibrium solvent</i> . 0.1% (v/v) TFA in water (stability: 1 week at room temperature).		
	4. <i>Sep-Pak C18 elution solvent</i> . Acetonitrile/water (80:20; v/v), 0.1% (v/v) TFA, for the elution of peptides and glycopeptides.		
	5. Graphitized carbon column elution solvent. Acetonitrile/water (25:75; v/v), 0.1% (v/v) TFA for the elution of N-glycans.		

The two elution solvents are stable for 1 week at room temperature.

2.6. Release of O-Glycans Using Reductive Elimination	1. <i>Release solution</i> . 50 mM NaOH solution with 1 M sodium borohydride (NaBH <sub>4</sub> ) prepared just before the experiment.
2.7. Desalting of the Released O-Glycans	1. Ion exchange chromatography Dowex 50 W-X8 beads (H <sup>+</sup> form; 50–100 mesh, BioRad, Hercules, CA) ( <i>see</i> Note 3).
	2. Acetic acid $(5\% \text{ v/v})$ solution in water.
	3. Coevaporation solvent: methanol/acetic acid (95:5; v/v).
	4. Pasteur pipettes $(230 \times 50 \text{ mm})$ (see Note 4).
2.8. Permethylation of Glycans	1. DMSO and iodomethane from Fluka (St. Gallen, Switzerland) kept anhydrous in an argon atmosphere.
	2. NaOH pellets (Carlo Erba, Rodano, Italy) kept anhydrous in an argon atmosphere.
	3. Mortar with pestle (See Note 5).
2.9. Clean-Up Proce-	1. Methanol, water, and acetonitrile of the highest purity available.
dure of Permethylated Glycans Using a Sep Pak C18	2. Elution solvent 1. Acetonitrile/water (10:90; v/v).
	3. Elution solvent 2. Acetonitrile/water (80:20; v/v).
2.10. On-Plate Exogly- cosidase Digestions	1. <i>Digest buffer</i> . 50 mM ammonium formiate. Adjust to pH 4.6 with a 25% (v/v) formic acid solution.
	2. $\alpha$ -Sialidase (E.C. 3.2.1.18), from <i>Arthrobacter ureafaciens</i> (Roche).
	3. $\beta$ -Galactosidase (EC 3.2.1.23) from bovine testis and $\alpha$ -fucosidase (EC 3.2.1.51) from bovine kidney (Sigma).
	<ol> <li>β-N-Acetylhexosaminidase (EC 3.2.1.30) from Jack bean (Calbiochem, San Diego, CA).</li> </ol>
2.11. Mass Spectrom- etry Analysis	1. The MALDI-TOF-MS instrument:Voyager Elite DE-STR Pro from PersSeptive Biosystem (Framingham, MA, USA) equipped with a pulsed nitrogen laser (337 nm) and a gridless delayed extraction ion source.
	2. <i>Matrix solution</i> . 10 mg/mL DHB in methanol/water (1:1; v/v).

## 3. Methods

The protocol suggested routinely generates good quality data from the MALDI-TOF mass spectrometer in our laboratory. These data can easily be obtained from several micrograms of glycans. The glycoprotein quantity must be chosen depending on its glycosylation level, which typically ranges between 2 and 40% (w/w). For a lower carbohydrate content, the glycoprotein quantity can be increased up to 2 mg. Over this limit, the retention capacity of the Dowex  $50 \times 8$  column becomes insufficient (*see* **Subheading 3.5**). Moreover, oligosaccharide profiling can also be obtained from a mixture of glycoproteins.

3.1. Reduction and Alkylation of the Glycoprotein	<ul> <li>Even though PNGase F is a very effective enzyme for the release of <i>N</i>-glycans chains, its use requires prior denaturation of the glycoprotein to increase its accessibility to the different glycosylation sites. The first step consists in opening all glycoprotein-containing disulfide bridges by reduction with DDT and blocking the free thiol groups by alkylation with iodoacetamide.</li> <li>1. The glycoprotein is dissolved at a concentration of 5–10 µg/µL in the degassed denaturing buffer and incubated for 1 h at 50°C.</li> <li>2. The reduction buffer is added to obtain a final concentration of 20 mM DTT. The sample is flushed with argon and incubated at 50°C for 4 h.</li> <li>3. The alkylating buffer is added to obtain a final concentration of 110 mM IAA. The sample is flushed with argon and incubated at room temperature overnight in the dark.</li> <li>4. In order to destroy the proteases which could contaminate the cellulose dialysis tube, the tube is cleaned by boiling for 10 min prior to use and extensively rinsing with water.</li> <li>5. The glycoprotein solution is then transferred into the dialysis solution at 4°C, with each change occurring after stirring for 12 h. For the last bath, EDTA is omitted from the dialysis buffer.</li> <li>6. The dialyzed solution is transferred into a glass tube and freeze-dried.</li> </ul>
3.2. Proteolytic Digestion of the Glycoprotein	<ul> <li>To facilitate the enzymatic de-N-glycosylation by increasing the accessibility of the PNGase F to its substrate, the reduced and carboxamidomethylated glycoprotein is submitted to a proteolytic digestion to generate small peptides and glycopeptides (<i>see</i> Note 6).</li> <li>1. The freeze-dried, reduced, and carboxamidomethylated glycoprotein is dissolved in trypsin solution with an enzyme/substrate ratio of 1:10 (by mass) and incubated for 24 h at 37°C under gently agitation.</li> </ul>
	2. Trypsin is then destroyed by boiling the solution for 10 min before the lyophlization step.
3.3. PNGase F Digestion	<ol> <li>The de-N-glycosylation step is carried out by dissolving the dried peptides and glycopeptides in 500 μL of the PNGase F buffer.</li> </ol>

PNGase F is added at the final concentration of 5 U/mg of glycoprotein and the digestion is carried out at 37 °C for 16 h (*see* Note 7). The reaction is terminated by lyophilization.

- 3.4. Clean-Up Procedure of the Released
   N-Glycan chains are separated from the peptides and O-glycopeptides using a Sep-Pak C18 cartridge. This clean-up procedure relies on the adsorption of peptides and O-glycopeptides on the hydrophobic C18 phase while N-glycans pass through this phase (see Note 8).
  - 2. Prior to use, the Sep-Pak C18 cartridge must be conditioned with 5 mL of methanol. Methanol is introduced into the cartridge using a Pasteur pipette until reaching the top of the longest end. A 5-mL glass syringe is then rapidly connected to the Sep-Pak C18 cartridge and filled with methanol. It is very important to not dry the C18 phase all through the procedure. The Sep-Pak C18 cartridge is then washed with 10 mL of equilibrium solvent.
  - 3. The dried sample is solubilized in 200  $\mu$ L of 0.1% (v/v) TFA and loaded directly onto the Sep-Pak C18 cartridge. From this time, the eluate must be immediately collected into a 4-mL screw-capped glass tube. The tube is rinsed twice with 200  $\mu$ L of 0.1% (v/v) TFA, and both solutions are again directly loaded onto the Sep-Pack C18 cartridge. The glass syringe is then immediately reconnected to the Sep-Pak C18 cartridge and filled with 3 mL of 0.1% (v/v) TFA, which is also collected. The glycans are lyophilized.
  - 4. Peptides and *O*-glycopeptides are eluted *en bloc* by 3 mL of the elution solvent. Prior to the freeze-drying step, the acetonitrile is removed under a stream of nitrogen in a fume hood.
  - 1. The resulting peptides/glycopeptides are dissolved in 200  $\mu$ L of the sodium hydroxide solution containing 1 M NaBH<sub>4</sub>, and incubated at 45°C for 16 h.
  - 2. The reaction mixture is left standing at room temperature for 5–10 min.
  - 3. The reaction is stopped by adding glacial acetic acid dropwise until no fizzing is observed (about 3–5 drops).
  - 1. The desalting column consists of a truncated Pasteur pipette, plugged at the tapered end with a small amount of glass wool. A piece of silicone tubing (about 2 cm) is placed at the tapered end, and the flow is blocked using an adjustable clip. The pipette is filled with 5% (v/v) acetic acid and the clip is opened slightly to let the equilibration buffer slowly flow out. While the 5% (v/v) acetic acid is running out, the column is filled with 2 mL of freshly washed Dowex beads ( $50 \times 8$ , H<sup>+</sup> form) (*see* Notes 3 and 9).
    - 2. The sample is loaded onto the column, and the unretained material containing the *O*-glycans and borate salts is immediately

*3.5. Release of O-Glycans Using Reductive Elimination* 

3.6. Purification of the Released O-Glycans

	<ul> <li>collected into a 4-mL screw-capped glass tube. The column is washed using 4 mL of 5% (v/v) acetic acid solution and the eluates (two fractions of 2 mL) are then lyophilized.</li> <li>3. Borate salts are removed by repeated evaporation with methanol containing 5% (v/v) acetic acid under a stream of nitrogen in a fume hood. For this purpose, the sample is solubilized in 500 μL of methanol/acetic acid (95:5, v/v) and dried. This procedure is repeated five times and the sample lyophilized.</li> </ul>
<i>3.7. Permethylation of Glycans</i>	<ul> <li>Aliquots of glycans are permethylated according to Ciucanu and Kerek's procedure (17).</li> <li>1. The tube containing the freeze-dried glycans is placed in a vacuum vessel saturated with an argon atmosphere and 500 μL of DMSO is added.</li> </ul>
	<ol> <li>A few pellets of NaOH (5–10) are placed in a dry mortar. The pellets of NaOH are quickly ground into a fine powder using the pestle.</li> <li>Also 25 and 601 OH is a block of the product of the produ</li></ol>
	<ol> <li>About 25 mg of NaOH is added to the sample.</li> <li>Iodomethane (300 μL) is added and the tube is flushed with a stream of argon. After mixing vigorously, the reaction mixture is placed in an ultrasonic bath for 2 h at room temperature.</li> </ol>
	<ol> <li>The reaction is then stopped by adding 1 mL of water, mixing vigorously.</li> </ol>
	6. Chloroform (600 $\mu$ L) is added and mixed vigorously, and the mixture is allowed to settle into two layers. The lower chloroform phase is transferred into a new glass tube. This chloroform extraction is repeated twice.
	7. Six successive washes of the chloroform phase are carried out with 1 volume of water ( <i>see</i> <b>Note 10</b> ). The aqueous phases are discarded.
	8. The chloroform phase is then dried under a stream of nitro- gen in a fume hood.
3.8. Clean-Up Proce- dure of Permethyl-	1. The dried sample is dissolved in about 200 $\mu$ L of methanol and purified using a Sep-Pak C18 cartridge.
ated Glycans Using a Sep-Pak C18	2. The Sep-Pak C18 cartridge is conditioned with 5 mL of methanol. Methanol is introduced into the cartridge using a Pasteur pipette until reaching the top of the longest end. A 5-mL glass syringe is then rapidly connected to the Sep-Pak C18 cartridge and filled with methanol.
	3. The cartridge is washed with 10 mL of water.
	4. The sample is loaded directly onto the Sep-Pack. The tube is rinsed twice with water and the solutions are again directly loaded onto the Sep-Pack cartridge.

5. The cartridge is sequentially washed with 15 mL of water and 2 mL of acetonitrile/water (10:90; v/v) mixture.

6. The permethylated glycans are eluted by 3 mL of the acetonitrile/water (80:20; v/v) mixture, partially evaporated under a stream of nitrogen in a fume hood to remove acetonitrile, and freeze-dried.

3.9. MALDI-TOF-MS Analysis of Permethylated Oligosaccharides

- 1. Permethylated glycans are dissolved in a methanol/water (1:1; v/v) solution to obtain a concentration of 10 pmol/µL.
- 2. Directly on the MALDI target, 1  $\mu$ L of the solution is mixed with 1  $\mu$ L of the DHB matrix solution. After crystallization at room temperature, the spectra are acquired by submitting each spot to multiple laser shots (100–200) and recorded by a TOF analyzer over a range of m/z 1,000–5,000 for permethylated *N*-glycans (**Fig. 1**) or m/z 300–5,000 for permethylated



Fig. 1. Positive MALDI-TOF-MS spectra of permethylated *N*-glycans from calf fetuin (**A**) and from the glycoproteins of the normal human serum (**B**). The *N*-glycans were released from tryptic glycopeptides by digestion with PNGase F, separated from peptides and *O*-glycopeptides by Sep-Pak purification, and permethylated. The derivatized glycans were purified by the Sep-Pak. Symbols: *open square* galactose; *filled square N*-acetylglucosamine; *crossed square* reduced *N*-acetylglactosamine; *filled triangle* fucose; *open triangle N*-acetyl neuraminic acid; *filled circle* mannose.



Fig. 2. Positive MALDI-TOF-MS spectra of permethylated *O*-glycans released from the calf fetuin (**A**) and from the glycoproteins of the normal human serum (**B**). *O*-glycans were released by reductive elimination, permethylated, purified by Sep-Pak C18, and analyzed by MALDI-TOF-MS as mixtures. Symbols are as in Fig. 1.

*O*-glycans (**Fig. 2**). The instrument is operated in the positive ion reflectron mode throughout. An irradiance slightly above the threshold of ion detection is used. Acceleration and reflector voltages are set up as follows: target voltage at 20 kV, first grid at 72% of target voltage, delayed extraction at 550 ns. Spectra are calibrated with an external mixture of isomaltosyl oligosaccharides containing 6–19 glucose units. In order to preclude low-mass ions from saturating the detector, the ion gate was set at 950 for the analysis of permethylated *N*-glycans and at 250 for the analysis of permethylated *O*-glycans.

**3.10. Purification of**<br/>the Underivatized<br/>**N-Glycans**The confirmation of glycan structures deduced from the MALDI-<br/>TOF-MS analysis of permethylated glycans can be obtained using<br/>specific exoglycosidases (*see* Note 11). Before making exogly-<br/>cosidase digestions, it is necessary to desalt the *N*-glycans using a<br/>carbograph column (19).

3.11. On-Plate Exogly-

cosidase Digestions of

**N-Glycans** 

 Prior to use, this column must be conditioned with 5 mL of methanol and washed with 10 mL of equilibrium solvent. Underivatized *N*-glycans are dissolved in 500 μL of equilibrium solution and loaded onto the column.

- 2. Salts are removed with 15 mL of equilibrium solution.
- 3. *N*-glycans are recovered by passing 3 mL of elution solvent through the column and directly freeze-drying.
- 1. The exoglycosidase digestions are carried out on the 100-well MALDI sample plate. One microliter of each sample (5–10 pmol) is directly mixed on the plate with 1  $\mu$ L of the reaction buffer (50 mM ammonium formiate, pH 4.6).
  - One microliter of each exoglycosidase is then added to each spotted sample at the following concentration: α-sialidase, 50 mU; β-galactosidase, 1.25 mU; β-N-acetylhexosaminidase, 150 mU; α-fucosidase, 7.7 mU. For each sample, the number of spots depends on the number of exoglycosidases, alone or in combination, to be tested.
  - 3. The MALDI plate is placed at 37°C for 6 h in a crystallization beaker containing water to saturate the atmosphere, thereby avoiding the drying of the drop at the surface of the target. In addition, high-purity water must be regularly added to the spots to prevent air-drying.
  - 4. The enzymatic reactions are stopped by allowing the samples to dry at room temperature.
  - 5. Two microliters of the matrix solution (DHB) is mixed with the dried samples and allowed to dry at room temperature. The MALDI-TOF-MS analysis is performed as described above (*see* **Subheading 3.9**). However, it is important to note that the spectra must be recorded over a range of m/z 900–5,000 for underivatized *N*-glycans.

An aliquot (15%) of the *N*-glycans released from 200  $\mu$ g of calf fetuin (**Fig. 3**) and 20  $\mu$ L of normal human serum (**Fig. 4**) has been used to illustrate this methodology.

The interpretation of the MALDI-TOF-MS spectra of permethylated and native glycans are given in **Tables 1** and **2**.

- 1. [M + Na]<sup>+</sup> values are obtained by adding the sum of the residual masses (**Table 1**) and the sum of the sodiated reducing and nonreducing end increments (**Table 2**).
- For O-glycans, it has to be kept in mind that they are reduced with NaBH<sub>4</sub> during their release from the peptidic chain. Therefore, [M + Na]<sup>+</sup> values for O-glycans are obtained by adding the sum of the residual masses (Table 1) and the sum of sodiated nonreducing and reduced reducing end increments (Table 2).

3.12. Assignments of Molecular lons Observed in MALDI-TOF-MS Spectra of Native and Permethylated Glycans



Fig. 3. MALDI-TOF-MS spectra of native *N*-glycans of the calf fetuin digested by  $\alpha$ -sialidase (**A**),  $\alpha$ -sialidase and  $\beta$ -galactosidase (**B**), and  $\alpha$ -sialidase and  $\beta$ -galactosidase and  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidase (**C**). Fetuin was reduced, carboxamidomethylated, and digested with trypsin. Glycans were then released from the resulting peptides/glycopeptides by digestion with PNGase F. Glycans released by PNGase F were separated from the peptides and *O*-glycopeptides using a Sep-Pak cartridge C18 and desalted on a nonporous graphitized carbon solid-phase extraction cartridge. The glycans were then analyzed in positive ion reflective mode after on-target exoglycosidase digestions, as [M + Na]<sup>+</sup> pseudomolecular ions. The ions marked with asterisks arise from contaminants. Symbols are as in Fig. 1.



	Native		Permethylated	
Terminal group	Accurate mass	Average mass	Accurate mass	Average mass
Reducing end	18.009	18.014	46.041	46.068
Reduced reducing end	20.025	20.030	62.072	62.111
Sum of masses with the sodium for <i>N</i> -glycans	40.998	41.004	69.030	69.058
Sum of masses with the sodium for reduced <i>O</i> -glycans	43.014	43.020	85.061	85.100

# Table 2Masses of nonreducing and reducing end moieties

## 4. Notes

- 1. EDTA is added in the dialysis solution to avoid protein degradation by proteases. However, since EDTA cannot be removed during the lyophilization step, it is omitted in the last dialysis bath.
- 2. Some commercial PNGases F can be stored at 20°C in presence of glycerol as preservative. However, for the MALDI-TOF-MS studies, glycerol prevents the cocrystallization of the DHB matrix and the sample. For this reason, we use only freeze-dried PNGase F without glycerol.
- 3. Prior to use, Dowex beads must be stabilized in the H<sup>+</sup> form as follows: Beads are treated twice with 3 volumes of 3 M NaOH for 30 min at room temperature. After extensively washing with water, the beads are treated twice with 3 volumes of a 3 M HCl solution for 30 min at room temperature. Beads are then sequentially washed with water until a neutral pH is obtained, and then washed again three times with

Fig. 4. MALDI-TOF-MS spectra of *N*-glycans released from normal human serum after treatment with  $\alpha$ -sialidase (**A**),  $\alpha$ -sialidase and  $\beta$ -galactosidase (**B**),  $\alpha$ -sialidase and  $\beta$ -galactosidase and  $\beta$ -n-acetylhexosaminidase (**C**) and  $\alpha$ -sialidase and  $\beta$ -galactosidase and  $\beta$ -n-acetylhexosaminidase (**C**). Proteins/glycoproteins were reduced, carboxamidomethylated, and digested with trypsin. Glycans were released from the resulting peptides/ glycopeptides by digestion with PNGase F. Glycans released by PNGase F were separated from peptides using a C18 Sep-Pak cartridge and desalted on a nonporous graphitized carbon solid-phase extraction cartridge. The glycans were then analyzed in positive ion reflective mode after on-target exoglycosidase digestions, as [M + Na]<sup>+</sup> pseudo-molecular ions. Symbols are as in Fig. 1.

3 volumes of 5% (v/v) acetic acid. Beads can be stored in the 5% (v/v) acetic acid solution for several months at room temperature. The beads are washed again three times with 3 volumes of 5% (v/v) acetic acid before packing the column.

- 4. The use of truncated Pasteur pipettes limits the volume of Dowex resin to 2 mL. In these conditions, it is possible to fully remove cationic materials (sodium salts, amino acids, and peptides) obtained from the reductive treatment of glycoproteins up to 2 mg.
- 5. The mortar and pestle must be placed in an oven. Thirty minutes before permethylation, they are taken out of the oven and allowed to remain at room temperature.
- 6. Since the PNGase F enzyme does not release any *N*-glycans when glycosylation sites are on the first or last amino acid residue of a peptide, the protease must be carefully chosen. For this reason, when PNGase F digestion is performed on one glycoprotein, the amino acid sequence of this glycoprotein must be known. Trypsin can be replaced by other proteases or by a chemical reagent such as cyanogen bromide in order to generate glycopeptides without glycosylation sites present on the first or last amino acid residue.
- 7. PNGase F releases practically all protein-bound N-linked carbohydrates except those with fucose attached to the 3 position of the Asn-linked GlcNAc residue. The corresponding glycoproteins are commonly found in plants and in insect cells. Such PNGase F-resistant glycans have been found to be sensitive to PNGase A, an enzyme found in almond emulsin.
- 8. In spite of their hydrophilic character, *N*-glycans interact very weakly with the hydrophobic C18 phase of the Sep-Pak cartridge. To ensure that they are recovered in the nonretained fractions, it is recommended to add 0.1% (v/v) TFA in the washing buffer to eliminate all interactions between oligosaccharides and the C18 phase.
- 9. Two milliliters of Dowex  $50 \times 8$  can retain the equivalent of 2 mg of glycoprotein. For higher quantities of glycoprotein, the volume of the column of Dowex  $50 \times 8$  must be proportionally increased.
- 10. In some cases, the chloroform phase can remain troubled even after six washings with water. It is not necessary to continue to wash the chloroform phase since the Sep-Pak  $C_{18}$  cartridge allows full removal of the remaining salts.
- 11. Before conducting on-plate exoglycosidase digestions, make sure that the quantity of oligosaccharide is sufficient. Therefore, it is necessary to perform the MALDI-TOF-MS analysis using 1  $\mu$ L of each sample (from 5 to 10 pmol) to check this point.

## Acknowledgments

This research was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (Unité Mixte de Recherche CNRS/USTL 8576; Director: Dr Jean-Claude Michalski), the Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur. The Mass Spectrometry facility used in this study was funded by the European Community (FEDER), the Région Nord-Pas de Calais (France), and the Université des Sciences et Technologies de Lille.

#### References

- 1. Hart, G.W. (1992) Glycosylation. Curr Opin Cell Biol. 4, 1017–1723.
- Kornfeld, R., and Kornfeld, S. (1985) Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem.* 54, 631–664.
- Rudd, P.M., Colominas, C., Royle, L., Murphy, N., Hart, E., Merry, A.H., Hebestreit, H.F., and Dwek, RA. (2001) A high-performance liquid chromatography based strategy for rapid, sensitive sequencing of N-linked oligosaccharide modifications to proteins in sodium dodecyl sulphate polyacrylamide electrophoresis gel bands. *Proteomics* 1, 285–294
- Takasaki, S., Mizuochi, T., and Kobata, A. (1982) Hydrazinolysis of asparagine-linked sugar chains to produce free oligosaccharides. *Methods Enzymol.* 83, 263–268.
- Huang, C.C., and Aminoff, D. (1972) Enzymes that destroy blood group specificity. V. The oligosaccharase of *Clostridium perfrin*gens. J. Biol. Chem. 247, 6737–6742.
- Ishii-KarakasaI., Iwase, H., HottaK., TanakaY., and Omura S. (1992) Partial purification and characterization of an endo-alpha-N-acetylgalactosaminidase from the culture medium of Streptomyces sp. OH-11242. *Biochem. J.*. 288, 475–482.
- Chai, W., Feizi, T., Yuen, C.T., and Lawson, A.M. (1997) Nonreductive release of O-linked oligosaccharides from mucin glycoproteins for structure/function assignments as neoglycolipids: application in the detection of novel ligands for E-selectin. *Glycobiology* 7, 861–872.
- Huang, Y., Mechref, Y., and Novotny, M.V. (2001) Microscale nonreductive release of O-linked glycans for subsequent analysis through MALDI mass spectrometry and capillary electrophoresis. *Anal. Chem.* 73, 6063–6069.
- Huang,Y.,Konse,T.,MechrefY.,andNovotny,M.V. (2002) Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry compatible beta-elimination of O-linked oligosaccharides. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 16, 1199–1204.

- Carlson, D.M. (1968) Structures and immunochemical properties of oligosaccharides isolated from pig submaxillary mucins. *J. Biol. Chem.* 243, 616–626.
- Harvey, D.J. (2005) Proteomic analysis of glycosylation: structural determination of Nand O-linked glycans by mass spectrometry. *Expert Rev. Proteomics* 2, 87–101.
- 12. Morelle, W., and Michalski, J.C. (2005) The mass spectrometric analysis of glycoproteins and their glycan content. *Curr. Anal. Chem.* 1, 29–57.
- Beavis, R.C., and Chait, B. (1990) High-accuracy molecular mass determination of proteins using matrix-assisted laser desorption mass spectrometry. *Anal. Chem.* 62, 1836–1840.
- Finke, B., Mank, M., Daniel, H., and Stahl, B. (2000) Offline coupling of low-pressure anion-exchange chromatography with MALDI-MS to determine the elution order of human milk oligosaccharides. *Anal. Biochem.* 284, 256–265.
- Powell, A.K. and Harvey, D.J. (1996) Stabilization of sialic acids in N-linked oligosaccharides and gangliosides for analysis by positive ion matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 10, 1027–1032.
- Sekiya, S., Wada, Y., and Tanaka, K. (2005) Derivatization for stabilizing sialic acids in MALDI-MS. *Anal Chem.* 77, 4962–4968.
- Ciucanu, I., and Kerek, F. (1984) A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydr.Res.* 131, 209–217.
- Albersheim, P., Nevins, D.J., English, P.D., and Karr, A. (1967) A method for the analysis of sugars in plant cell wall polysaccharides by gas-liquid chromatography. *Carbohydr. Res.*, 5, 340–345.
- 19. Packer, N.H., Lawson, M.A., Jardine, D.R., and Redmond, J.W. (1998) A general approach to desalting oligosaccharides released from glycoproteins. *Glycoconj J.* 15, 737–747.

Les objectifs de nos travaux de thèse étaient fondés sur la mise au point d'approches de glycomique appliquées à l'étude de la glycosylation de protéines particulières, comme la bLAMAN, ou de fluides biologiques d'intérêt, tels que le plasma sanguin et l'urine, qui renferment de précieux glycobiomarqueurs, particulièrement utiles pour le dépistage des pathologies métaboliques des glycoprotéines. Nos travaux de thèse ont consisté en (1) l'étude structurale de la glycosylation de la bLAMAN ; et en (2) la mise au point d'approches de profilage spectrométrique des glycannes libres urinaires ou de glycannes N-/O-liés aux protéines plasmatiques, constituant respectivement de précieux indicateurs du métabolisme des glycoprotéines.

Dans un premier temps, nous avons cartographié la glycosylation par site de la bLAMAN, dans le cadre du programme européen « EURAMAN ». Nos résultats ont confirmé la présence des structures immatures Glc<sub>0-1</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub> sur le site Asn<sup>497</sup> (peptide c). Ces glycannes jouent le rôle d'ancre structurale, en interagissant avec des zones peptidiques, en conférant à la structure protéique une importante rigidité structurale et une grande stabilité lysosomale. Nos résultats ont également confirmé la localisation de structures oligomannosidiques et hybrides au niveau des sites Asn<sup>367</sup> (peptide b), Asn<sup>766</sup> (peptide d) et Asn<sup>930</sup> (peptide e), pouvant constituer les candidats potentiels pour la formation du signal d'adressage lysosomal, comme l'avaient suggéré Heikinheimo et al. (2003). Enfin, nous avons également confirmé la présence de structures oligomannosidiques tronquées et à chaîne courte (Man<sub>3-5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>) pouvant être ( $\alpha$ 1-6)-fucosylées. Ce résultat confirme ceux obtenus sur un grand nombre de glycoprotéines lysosomales, d'une part, et les résultats de Crispin et al. qui démontrèrent la possibilité pour les cellules CHO déficientes en GlcNAc T I de fucosyler en ( $\alpha$ 1-6) le résidu de GlcNAc proximal des N-glycannes, y compris ceux de type oligomannosidique, d'autre part. L'ensemble des résultats, collectés au cours de cette étude, constitue une base solide de travail pour la cartographie de la glycosylation par site de la rhLAMAN, utilisée pour le traitement enzymatique substitutif expérimental de l'amannosidose.

Dans un second temps, notre travail de thèse a consisté en la mise au point de procédés de glycomique, dédiés au profilage des oligosacchariduries et des sialuries. Ces travaux ont été réalisés dans le contexte de l'institut des maladies rares, dont l'un des soucis consiste en l'élaboration de méthodologies analytiques globales, dédiées à l'exploration des différents métabolismes cellulaires, dont celui des glycoprotéines, à grande échelle. Dans ce cadre, nous

avons mis au point une double méthodologie de (1) détection et quantification du NeuAc libre urinaire, pour le dépistage et le typage des sialuries; et de (2) profilage rapide des oligosaccharides et glycoasparagines urinaires, pour le dépistage et le typage des glycoprotéinoses. Cette méthodologie a été validée sur un modèle de sialurie type français, sept modèles de glycoprotéinoses (sialidose, ICD, maladie de Morquio, maladie de Sandhoff,  $\alpha$ -mannosidose, fucosidose et aspartylglucosaminurie) et un modèle de la maladie de Pompe. Appliquée à l'étude du profil d'excrétion urinaire en oligosaccharides d'un cas de βmannosidose, nous avons pu mettre en évidence onze glycobiomarqueurs spécifiques, dont neuf n'ont jamais été décrits chez l'homme. L'analyse structurale partielle de leur dérivé deutéroréduit a permis de conclure que ces oligosaccharides résultent de l'élongation de l'accumulat primaire par les glycosyltransférases golgiennes, vraisemblablement libérées suite à la perte de compartimentation subcellulaire, au moment de la cytolyse, comme c'est le cas de l'aspartylglucosaminurie. Or, les résultats de l'analyse structurale ont également montré qu'une partie de ces structures résulterait de transfert « en bloc » séquentiel d'unités Man(B1-4)GlcNAc sur l'accumulat primaire lui-même. Les acteurs et les conditions biochimiques de réalisation d'une telle réaction demeurent néanmoins inconnus. Cependant, des examens biochimiques plus poussés devraient être envisagés, dans le but d'identifier les acteurs moléculaires associés à synthèses atypiques, observées de ces au cours l'aspartylglucosaminurie et de la  $\beta$ -mannosidose.

Dans un troisième temps, nos travaux de thèse ont consisté en la mise au point d'approches de glycomique, dédiées au dépistage et au typage rapides des anomalies congénitales de glycosylation (CDG). Ce travail a également été réalisé dans le cadre de l'institut des maladies rares, dans le souci de l'exploration de la biosynthèse des glycoprotéines cellulaires, à grande échelle. Ainsi, la microanalyse rapide de 30 µL de plasma sanguin a permis le profilage du N- et du O-glycome total des glycoprotéines plasmatiques totales. Cette méthodologie a été validée sur deux modèles de CDG, une déficience en GlcNAc T II (CDG-IIa) et une déficience en protéine COG 1 (CDG-IIg), chez lesquels des glycobiomarqueurs spécifiques ont été identifiés.

L'ensemble de ces méthodologies de glycomique devrait contribuer, nous l'espérons, à la simplification des protocoles de dépistage biochimique des maladies métaboliques des glycoprotéines, chez un nombre croissant de patients souffrant de pathologies métaboliques congénitales, d'étiologie encore inconnue.

# REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

# A

Abraham D, Blakemore WF, Jolly RD, Sidebotham R, Winchester B. The catabolism of mammalian glycoproteins. Comparison of the storage products in bovine, feline and human mannosidosis. Biochem J. 1983; 215(3):573-9.

Adamowicz M, Pronicka E. Carbohydrate deficient glycoprotein syndrome--like transferrin isoelectric focusing pattern in untreated fructosaemia. Eur J Pediatr. 1996; 155(4):347-8.

Adamowicz M, Płoski R, Rokicki D, Morava E, Gizewska M, Mierzewska H, Pollak A, Lefeber DJ, Wevers RA, Pronicka E. Transferrin hypoglycosylation in hereditary fructose intolerance: using the clues and avoiding the pitfalls. J Inherit Metab Dis. 2007; 30(3):407.

Adar R, Streicher H, Rozenblatt S, Sharon N. Synthesis of soybean agglutinin in bacterial and mammalian cells. Eur J Biochem. 1997; 249(3):684-9.

Aebi M, Helenius A, Schenk B, Barone R, Fiumara A, Berger EG, Hennet T, Imbach T, Stutz A, Bjursell C, Uller A, Wahlström JG, Briones P, Cardo E, Clayton P, Winchester B, Cormier-Dalre V, de Lonlay P, Cuer M, Dupré T, Seta N, de Koning T, Dorland L, de Loos F, Kupers L, et al. Carbohydrate-deficient glycoprotein syndromes become congenital disorders of glycosylation: an updated nomenclature for CDG. First International Workshop on CDGS. Glycoconj J. 1999; 16(11):669-71.

Ahner A, Brodsky JL. Checkpoints in ER-associated degradation: excuse me, which way to the proteasome? Trends Cell Biol. 2004; 14(9):474-8.

Akama TO, Nishida K, Nakayama J, Watanabe H, Ozaki K, Nakamura T, Dota A, Kawasaki S, Inoue Y, Maeda N, Yamamoto S, Fujiwara T, Thonar EJ, Shimomura Y, Kinoshita S, Tanigami A, Fukuda MN. Macular corneal dystrophy type I and type II are caused by distinct mutations in a new sulphotransferase gene. Nat Genet. 2000; 26(2):237-41.

al Daher S, de Gasperi R, Daniel P, Hall N, Warren CD, Winchester B. The substratespecificity of human lysosomal alpha-D-mannosidase in relation to genetic alphamannosidosis. Biochem J. 1991; 277 (Pt 3):743-51. Allen AC, Bailey EM, Brenchley PE, Buck KS, Barratt J, Feehally J. Mesangial IgA1 in IgA nephropathy exhibits aberrant O-glycosylation: observations in three patients. Kidney Int. 2001; 60(3):969-73.

Alving K, Paulsen H, Peter-Katalinic J. Characterization of O-glycosylation sites in MUC2 glycopeptides by nanoelectrospray QTOF mass spectrometry. J Mass Spectrom. 1999; 34(4):395-407.

Anderson DC, Springer TA. Leukocyte adhesion deficiency: an inherited defect in the Mac-1, LFA-1, and p150,95 glycoproteins. Annu Rev Med. 1987;38:175-94.

Angata T, Brinkman-Van der Linden E. I-type lectins. Biochim Biophys Acta. 2002; 1572(2-3):294-316.

Annesley TM. Ion suppression in mass spectrometry. Clin Chem. 2003; 49(7):1041-4.

Apweiler R, Hermjakob H, Sharon N. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database.Biochim Biophys Acta. 1999; 1473(1):4-8.

Aravind L, Koonin EV. The fukutin protein family--predicted enzymes modifying cellsurface molecules. Curr Biol. 1999; 9(22):R836-7

Arnold U, Ulbrich-Hofmann R. Proteolytic degradation of ribonuclease A in the pretransition region of thermally and urea-induced unfolding. Eur J Biochem. 2001; 268(1):93-7.

Arnold JN, Wormald MR, Sim RB, Rudd PM, Dwek RA. The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. Annu Rev Immunol. 2007;25:21-50.

Aronson NN Jr. Aspartylglycosaminuria: biochemistry and molecular biology. Biochim Biophys Acta. 1999; 1455(2-3):139-54.

Aronson NN Jr, Kuranda MJ. Lysosomal degradation of Asn-linked glycoproteins. FASEB J. 1989; 3(14):2615-22.

Arndt T. Carbohydrate-deficient transferrin as a marker of chronic alcohol abuse: a critical review of preanalysis, analysis, and interpretation. Clin Chem. 2001; 47(1):13-27.

Askanas V, Engel WK. Sporadic inclusion-body myositis and hereditary inclusion-body myopathies: current concepts of diagnosis and pathogenesis. Curr Opin Rheumatol. 1998; 10(6):530-42.

Ashwell G, Harford J. Carbohydrate-specific receptors of the liver. Annu Rev Biochem. 1982; 51:531-54.

Aubert JP, Helbecque N, Loucheux-Lefebvre MH. Circular dichroism studies of synthetic Asn-X-Ser/Thr-containing peptides: Structure-glycosylation relationship. Arch Biochem Biophys. 1981; 208(1):20-9.

Aula P, Autio S, Raivio KO, Rapola J, Thodén CJ, Koskela SL, Yamashina I. "Salla disease": a new lysosomal storage disorder. Arch Neurol. 1979; 36(2):88-94.

# B

Baboval T, Koul O, Smith FI. N-glycosylation site occupancy of rat alpha-1,3fucosyltransferase IV and the effect of glycosylation on enzymatic activity. Biochim Biophys Acta. 2000 Jul 26; 1475(3):383-9.

Baenziger JU, Green ED. Pituitary glycoprotein hormone oligosaccharides: structure, synthesis and function of the asparagine-linked oligosaccharides on lutropin, follitropin and thyrotropin. Biochim Biophys Acta. 1988; 947(2):287-306.

Barton NW, Brady RO, Dambrosia JM, Di Bisceglie AM, Doppelt SH, Hill SC, Mankin HJ, Murray GJ, Parker RI, Argoff CE, et al. Replacement therapy for inherited enzyme deficiency--macrophage-targeted glucocerebrosidase for Gaucher's disease. N Engl J Med. 1991; 324(21):1464-70.

Barton GM, Medzhitov R. Toll-like receptor signaling pathways. Science. 2003; 300(5625):1524-5.

Bedilu R, Nummy KA, Cooper A, Wevers R, Smeitink J, Kleijer WJ, Friderici KH. Variable clinical presentation of lysosomal beta-mannosidosis in patients with null mutations. Mol Genet Metab. 2002; 77(4):282-90.

Berg T, Healy PJ, Tollersrud OK, Nilssen O. Molecular heterogeneity for bovine alphamannosidosis: PCR based assays for detection of breed-specific mutations. Res Vet Sci. 1997; 63(3):279-82.

Berg T, Hopwood JJ. alpha-Mannosidosis in the guinea pig: cloning of the lysosomal alphamannosidase cDNA and identification of a missense mutation causing alpha-mannosidosis. Biochim Biophys Acta. 2002; 1586(2):169-76.

Berg T, King B, Meikle PJ, Nilssen Ø, Tollersrud OK, Hopwood JJ. Purification and characterization of recombinant human lysosomal alpha-mannosidase. Mol Genet Metab. 2001; 73(1):18-29.

Berg T, Riise HM, Hansen GM, Malm D, Tranebjaerg L, Tollersrud OK, Nilssen O. Spectrum of mutations in alpha-mannosidosis. Am J Hum Genet. 1999; 64(1):77-88.

Berg T, Tollersrud OK, Walkley SU, Siegel D, Nilssen O. Purification of feline lysosomal alpha-mannosidase, determination of its cDNA sequence and identification of a mutation causing alpha-mannosidosis in Persian cats. Biochem J. 1997; 328 (Pt 3):863-70.

Bigge JC, Patel TP, Bruce JA, Goulding PN, Charles SM, Parekh RB. Nonselective and efficient fluorescent labeling of glycans using 2-amino benzamide and anthranilic acid. Anal Biochem. 1995; 230(2):229-38.

Bond A, Alavi A, Axford JS, Youinou P, Hay FC. The relationship between exposed galactose and N-acetylglucosamine residues on IgG in rheumatoid arthritis (RA), juvenile chronic arthritis (JCA) and Sjögren's syndrome (SS). Clin Exp Immunol. 1996; 105(1):99-103.

Bortolotti F, De Paoli G, Pascali JP, Tagliaro F. Fully automated analysis of Carbohydrate-Deficient Transferrin (CDT) by using a multicapillary electrophoresis system. Clin Chim Acta. 2007.

Bosques CJ, Imperiali B. The interplay of glycosylation and disulfide formation influences fibrillization in a prion protein fragment. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003; 100(13):7593-8.

Bryan L, Schmutz S, Hodges SD, Snyder FF. Bovine beta-mannosidase deficiency. Biochem Biophys Res Commun. 1990; 173(2):491-5.

Briones P, Vilaseca MA, García-Silva MT, Pineda M, Colomer J, Ferrer I, Artigas J, Jaeken J, Chabás A. Congenital disorders of glycosylation (CDG) may be underdiagnosed when mimicking mitochondrial disease. Eur J Paediatr Neurol. 2001;5(3):127-31.

Brockhausen I. The biosynthesis of O-glycosylproteins. In Montreul J, Vliegenhthart JFG and Schachter H (eds.) Glycoproteins. Elsevier, Amsterdam. 1995; 201–259.

Brockhausen I. Pathways of O-glycan biosynthesis in cancer cells. Biochim Biophys Acta. 1999; 1473(1):67-95.

Brockington M, Blake DJ, Brown SC, Muntoni F. The gene for a novel glycosyltransferase is mutated in congenital muscular dystrophy MDC1C and limb girdle muscular dystrophy 2I. Neuromuscul Disord. 2002; 12(3):233-4.

Brockington M, Torelli S, Prandini P, Boito C, Dolatshad NF, Longman C, Brown SC, Muntoni F. Localization and functional analysis of the LARGE family of glycosyltransferases: significance for muscular dystrophy. Hum Mol Genet. 2005; 14(5):657-65.

Bulöw HE, Hobert O. The molecular diversity of glycosaminoglycans shapes animal development. Annu Rev Cell Dev Biol. 2006; 22:375-407.

Burda P, Aebi M. The dolichol pathway of N-linked glycosylation. Biochim Biophys Acta. 1999; 1426(2):239-57.

# C

Cacan R, Dengremont C, Labiau O, Kmiecik D, Mir AM, Verbert A. Occurrence of a cytosolic neutral chitobiase activity involved in oligomannoside degradation: a study with Madin-Darby bovine kidney (MDBK) cells.Biochem J. 1996; 313 (Pt 2):597-602.

Callahan JW. Molecular basis of GM1 gangliosidosis and Morquio disease, type B. Structurefunction studies of lysosomal beta-galactosidase and the non-lysosomal beta-galactosidaselike protein. Biochim Biophys Acta. 1999; 1455(2-3):85-103. Callewaert N, Schollen E, Vanhecke A, Jaeken J, Matthijs G, Contreras R. Increased fucosylation and reduced branching of serum glycoprotein N-glycans in all known subtypes of congenital disorder of glycosylation I. Glycobiology. 2003;13(5):367-75.

Carlson DM. Structures and immunochemical properties of oligosaccharides isolated from pig submaxillary mucins. J Biol Chem. 1968; 243(3):616-26.

Carson DA, Chen PP, Fox RI, Kipps TJ, Jirik F, Goldfien RD, Silverman G, Radoux V, Fong S. Rheumatoid factor and immune networks. Annu Rev Immunol. 1987; 5:109-26.

Cataldi TR, Campa C, De Benedetto GE. Carbohydrate analysis by high-performance anionexchange chromatography with pulsed amperometric detection: the potential is still growing. Fresenius J Anal Chem. 2000; 368(8):739-58.

Ceuterick C, Martin JJ. Sporadic early adult-onset distal myopathy with rimmed vacuoles: immunohistochemistry and electron microscopy. J Neurol Sci. 1996; 139(2):190-6.

Chai W, Yuen CT, Kogelberg H, Carruthers RA, Margolis RU, Feizi T, Lawson AM. High prevalence of 2-mono- and 2,6-di-substituted manol-terminating sequences among O-glycans released from brain glycopeptides by reductive alkaline hydrolysis. Eur J Biochem. 1999; 263(3):879-88.

Charlwood J, Clayton P, Keir G, Mian N, Winchester B. Defective galactosylation of serum transferrin in galactosemia. Glycobiology. 1998; 8(4):351-7.

Chavin SI, Weidner SM. Blood clotting factor IX. Loss of activity after cleavage of sialic acid residues. J Biol Chem. 1984; 259(6):3387-90.

Cheng SH, Malcolm S, Pemble S, Winchester B. Purification and comparison of the structures of human liver acidic alpha-D-mannosidases A and B. Biochem J. 1986; 233(1):65-72.

Chiba A, Matsumura K, Yamada H, Inazu T, Shimizu T, Kusunoki S, Kanazawa I, Kobata A, Endo T. Structures of sialylated O-linked oligosaccharides of bovine peripheral nerve alphadystroglycan. The role of a novel O-mannosyl-type oligosaccharide in the binding of alphadystroglycan with laminin. J Biol Chem. 1997; 272(4):2156-62. Chiesa C, O'Neill RA. Capillary zone electrophoresis of oligosaccharides derivatized with various aminonaphthalene sulfonic acids. Electrophoresis. 1994; 15(8-9):1132-40.

Ciucanu I, Costello CE. Elimination of oxidative degradation during the per-O-methylation of carbohydrates. J Am Chem Soc. 2003; 125(52):16213-9.

Ciucanu I, Kerek F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. Carbohydr. Res. 1984; 131 : 209.

Conley ME, Cooper MD, Michael AF. Selective deposition of immunoglobulin A1 in immunoglobulin A nephropathy, anaphylactoid purpura nephritis, and systemic lupus erythematosus.J Clin Invest. 1980; 66(6):1432-6.

Cori GT. Biochemical aspects of glycogen deposition disease. Bibl Paediatr. 1958; 14(66):344-58.

Cottalasso D, Gazzo P, Dapino D, Domenicotti C, Pronzato MA, Traverso N, Bellocchio A, Nanni G, Marinari UM. Effect of chronic ethanol consumption on glycosylation processes in rat liver microsomes and Golgi apparatus. Alcohol Alcohol. 1996; 31(1):51-9.

Crawley AC, King B, Berg T, Meikle PJ, Hopwood JJ. Enzyme replacement therapy in alphamannosidosis guinea-pigs. Mol Genet Metab. 2006; 89(1-2):48-57.

Crispin M, Harvey DJ, Chang VT, Yu C, Aricescu AR, Jones EY, Davis SJ, Dwek RA, Rudd PM. Inhibition of hybrid- and complex-type glycosylation reveals the presence of the GlcNAc transferase I-independent fucosylation pathway. Glycobiology. 2006; 16(8):748-56.

Crivellente F, Fracasso G, Valentini R, Manetto G, Riviera AP, Tagliaro F. Improved method for carbohydrate-deficient transferrin determination in human serum by capillary zone electrophoresis. J Chromatogr B Biomed Sci Appl. 2000; 739(1):81-93.

Cuervo AM. Autophagy: many paths to the same end. Mol Cell Biochem. 2004; 263(1-2):55-72.

Cummings RD. Use of lectins in analysis of glycoconjugates. Methods Enzymol. 1994; 230:66-86.

Cuozzo JW, Tao K, Cygler M, Mort JS, Sahagian GG. Lysine-based structure responsible for selective mannose phosphorylation of cathepsin D and cathepsin L defines a common structural motif for lysosomal enzyme targeting. J Biol Chem. 1998; 273(33):21067-76.

# D

d'Azzo A, Andria G, Strisciuglio P, Galjaard H. Galactosialidosis. In Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., and Valle, D. (eds), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8th ed.* McGraw-Hill, New York. 2001; Vol. III, pp. 3811–3826.

Dahms NM, Hancock MK. P-type lectins. Biochim Biophys Acta. 2002; 1572(2-3):317-40.

Daniel PF, Winchester B, Warren CD. Mammalian alpha-mannosidases--multiple forms but a common purpose? Glycobiology. 1994; 4(5):551-66.

Darling RJ, Kuchibhotla U, Glaesner W, Micanovic R, Witcher DR, Beals JM. Glycosylation of erythropoietin affects receptor binding kinetics: role of electrostatic interactions. Biochemistry. 2002; 41(49):14524-31.

Davril M, Degroote S, Humbert P, Galabert C, Dumur V, Lafitte JJ, Lamblin G, Roussel P. The sialylation of bronchial mucins secreted by patients suffering from cystic fibrosis or from chronic bronchitis is related to the severity of airway infection. Glycobiology. 1999; 9(3):311-21.

Dawson PA, Markovich D. Pathogenetics of the human SLC26 transporters. Curr Med Chem. 2005;12(4):385-96.

Dear AE, Medcalf RL. The urokinase-type-plasminogen-activator receptor (CD87) is a pleiotropic molecule. Eur J Biochem. 1998; 252(2):185-93.

de Beer T, Vliegenthart JF, Loffler A, Hofsteenge J. The hexopyranosyl residue that is C-glycosidically linked to the side chain of tryptophan-7 in human RNase Us is alphamannopyranose. Biochemistry. 1995; 34(37):11785-9. de Lonlay P, Cuer M, Vuillaumier-Barrot S, Beaune G, Castelnau P, Kretz M, Durand G, Saudubray JM, Seta N. Hyperinsulinemic hypoglycemia as a presenting sign in phosphomannose isomerase deficiency: A new manifestation of carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome treatable with mannose. J Pediatr. 1999;135(3):379-83.

de Loos F, Huijben KM, van der Kar NC, Monnens LA, van den Heuvel LP, Groener JE, de Moor RA, Wevers RA. Hemolytic uremic syndrome attributable to Streptococcus pneumoniae infection: a novel cause for secondary protein N-glycan abnormalities. Clin Chem. 2002; 48(5):781-4. Erratum in: Clin Chem 2002; 48(7):1142.

Delorme E, Lorenzini T, Giffin J, Martin F, Jacobsen F, Boone T, Elliott S. Role of glycosylation on the secretion and biological activity of erythropoietin. Biochemistry. 1992; 31(41):9871-6.

Demelbauer UM, Zehl M, Plematl A, Allmaier G, Rizzi A. Determination of glycopeptide structures by multistage mass spectrometry with low-energy collision-induced dissociation: comparison of electrospray ionization quadrupole ion trap and matrix-assisted laser desorption/ionization quadrupole ion trap reflectron time-of-flight approaches. Rapid Commun Mass Spectrom. 2004; 18(14):1575-82.

Dennis JW, Granovsky M, Warren CE. Glycoprotein glycosylation and cancer progression. Biochim Biophys Acta. 1999; 1473(1):21-34.

de Praeter CM, Gerwig GJ, Bause E, Nuytinck LK, Vliegenthart JF, Breuer W, Kamerling JP, Espeel MF, Martin JJ, De Paepe AM, Chan NW, Dacremont GA, Van Coster RN. A novel disorder caused by defective biosynthesis of N-linked oligosaccharides due to glucosidase I deficiency. Am J Hum Genet. 2000; 66(6):1744-56.

Desnick, RJ, Schindler D. &-N-acetylgalactosaminidase deficiency: Schindler disease. In The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. 8th edition. C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly, and D. Valle, editors. McGraw-Hill, New York. 2001; 3483–3505.

Desnick RJ, Schuchman EH. Enzyme replacement and enhancement therapies: lessons from lysosomal disorders. Nat Rev Genet. 2002 Dec;3(12):954-66. Review. Erratum in: Nat Rev Genet. 2003; 4(2):157.
Desnick RJ, Wang AM. Schindler disease: an inherited neuroaxonal dystrophy due to alpha-N-acetylgalactosaminidase deficiency. J Inherit Metab Dis. 1990; 13(4):549-59.

Domon B, Costello CE. Structure elucidation of glycosphingolipids and gangliosides using high-performance tandem mass spectrometry. Biochemistry. 1988; 27(5):1534-43.

Doody GM, Justement LB, Delibrias CC, Matthews RJ, Lin J, Thomas ML, Fearon DT. A role in B cell activation for CD22 and the protein tyrosine phosphatase SHP. Science. 1995; 269(5221):242-4.

Dordal MS, Wang FF, Goldwasser E. The role of carbohydrate in erythropoietin action. Endocrinology. 1985; 116(6):2293-9.

Dorland L, Haverkamp J, Viliegenthart JF, Strecker G, Michalski JC, Fournet B, Spik G, Montreuil J. 360-MHz 1H nuclear-magnetic-resonance spectroscopy of sialyloligosaccharides from patients with sialidosis (mucolipidosis I and II). Eur J Biochem. 1978 Jun 15; 87(2):323-9.

Doucey MA, Hess D, Blommers MJ, Hofsteenge J. Recombinant human interleukin-12 is the second example of a C-mannosylated protein. Glycobiology. 1999; 9(5):435-41.

Dunn WA Jr. Autophagy and related mechanisms of lysosome-mediated protein degradation. Trends Cell Biol. 1994; 4(4):139-43.

Durand P, Borrone C, Della Cella G. Fucosidosis. J Pediatr. 1969; 75(4):665-74.

Durand P, Gatti R, Cavalieri S, Borrone C, Tondeur M, Michalski JC, Strecker G. Sialidosis (mucolipidosis I). Helv Paediatr Acta. 1977; 32(4-5):391-400.

Dwek RA. Glycobiology: Toward Understanding the Function of Sugars. Chem Rev. 1996; 96(2):683-720.

## E

Egge H, Michalski JC, Strecker G. Heterogeneity of urinary oligosaccharides from mannosidosis: mass spectrometric analysis of permethylated Man9, Man8, and Man7 derivatives. Arch Biochem Biophys. 1982; 213(1):318-26.

Ellgaard L, Helenius A. Quality control in the endoplasmic reticulum. Nat Rev Mol Cell Biol. 2003; 4(3):181-91.

Endo T. Structure, function and pathology of O-mannosyl glycans. Glycoconj J. 2004; 21(1-2):3-7.

Endo T, Toda T. Glycosylation in congenital muscular dystrophies. Biol Pharm Bull. 2003; 26(12):1641-7.

## F

Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. Science. 1989; 246(4926):64-71.

Fontaine G, Biserte G, Montreuil J, Dupont A, Farriaux JP. [Sialuria: an original metabolic disorder] Helv Paediatr Acta. 1968; Suppl 17:1-32.

Forgac M. Structure and function of vacuolar class of ATP-driven proton pumps. Physiol Rev. 1989; 69(3):765-96.

Freeze HH. Congenital Disorders of Glycosylation: CDG-I, CDG-II, and beyond.Curr Mol Med. 2007; 7(4):389-96.

Freeze HH. Novel perspectives on glycosylation and human disease. Curr Mol Med. 2007; 7(4):387.

Fukuda MN. HEMPAS. Hereditary erythroblastic multinuclearity with positive acidified serum lysis test. Biochim Biophys Acta. 1999; 1455(2-3):231-9.

Fuller M, Rozaklis T, Ramsay SL, Hopwood JJ, Meikle PJ. Disease-specific markers for the mucopolysaccharidoses. Pediatr Res. 2004; 56(5):733-8.

Fusetti F, Schroter KH, Steiner RA, van Noort PI, Pijning T, Rozeboom HJ, Kalk KH, Egmond MR, Dijkstra BW. Crystal structure of the copper-containing quercetin 2,3-dioxygenase from Aspergillus japonicus. Structure. 2002; 10(2):259-68.

Futerman AH, van Meer G. The cell biology of lysosomal storage disorders. Nat Rev Mol Cell Biol. 2004; 5(7):554-65.

## G

Grabowski GA, Hopkin RJ. Enzyme therapy for lysosomal storage disease: principles, practice, and prospects. Annu Rev Genomics Hum Genet. 2003; 4:403-36

Galili U. Abnormal expression of alpha-galactosyl epitopes in man. A trigger for autoimmune processes? Lancet. 1989; 2(8659):358-61.

Galili U. Xenotransplantation and ABO incompatible transplantation: the similarities they share. Transfus Apher Sci. 2006; 35(1):45-58.

Gavel Y, von Heijne G. Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering. Protein Eng. 1990; 3(5):433-42.

Geng M, Zhang X, Bina M, Regnier F. Proteomics of glycoproteins based on affinity selection of glycopeptides from tryptic digests. J Chromatogr B Biomed Sci Appl. 2001; 752(2):293-306.

Geyer H, Geyer R. Strategies for analysis of glycoprotein glycosylation. Biochim Biophys Acta. 2006; 1764(12):1853-69

Geyer R, Geyer H. Saccharide linkage analysis using methylation and other techniques. Methods Enzymol. 1994; 230:86-108. Geyer H, Schmitt S, Wuhrer M, Geyer R. Structural analysis of glycoconjugates by on-target enzymatic digestion and MALDI-TOF-MS. Anal Chem. 1999; 71(2):476-82.

Ghosh P, Dahms NM, Kornfeld S. Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale. Nat Rev Mol Cell Biol. 2003; 4(3):202-12.

Ghosh P, Okoh C, Liu QH, Lakshman MR. Effects of chronic ethanol on enzymes regulating sialylation and desialylation of transferrin in rats. Alcohol Clin Exp Res. 1993; 17(3):576-9.

Gordon BA, Rupar CA, Rip JW, Haust MD, Coulter-Mackie MB, Scott E, Hinton GG. Aspartylglucosaminuria in a Canadian family. Clin Invest Med. 1998; 21(3):114-23.

Gornik I, Maravić G, Dumić J, Flögel M, Lauc G. Fucosylation of IgG heavy chains is increased in rheumatoid arthritis. Clin Biochem. 1999; 32(8):605-8.

Götte M, Kresse H. Defective glycosaminoglycan substitution of decorin in a patient with progeroid syndrome is a direct consequence of two point mutations in the galactosyltransferase I (beta4GalT-7) gene. Biochem Genet. 2005; 43(1-2):65-77.

Grünewald S, Huyben K, de Jong JG, Smeitink JA, Rubio E, Boers GH, Conradt HS, Wendel U, Wevers RA. beta-Trace protein in human cerebrospinal fluid: a diagnostic marker for N-glycosylation defects in brain. Biochim Biophys Acta. 1999; 1455(1):54-60.

Guile GR, Wong SY, Dwek RA. Analytical and preparative separation of anionic oligosaccharides by weak anion-exchange high-performance liquid chromatography on an inert polymer column. Anal Biochem. 1994; 222(1):231-5.

Guttman A, Chen FT, Evangelista RA. Separation of 1-aminopyrene-3,6,8-trisulfonatelabeled asparagine-linked fetuin glycans by capillary gel electrophoresis. Electrophoresis. 1996; 17(2):412-7.

## Η

Hakomori S. Glycosylation defining cancer malignancy: new wine in an old bottle. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002; 99(16):10231-3.

Hägglund P, Bunkenborg J, Elortza F, Jensen ON, Roepstorff P. A new strategy for identification of N-glycosylated proteins and unambiguous assignment of their glycosylation sites using HILIC enrichment and partial deglycosylation. J Proteome Res. 2004; 3(3):556-66.

Håkansson K, Cooper HJ, Emmett MR, Costello CE, Marshall AG, Nilsson CL. Electron capture dissociation and infrared multiphoton dissociation MS/MS of an N-glycosylated tryptic peptic to yield complementary sequence information. Anal Chem. 2001; 73(18):4530-6.

Hallgren P, Hansson G, Henriksson KG, Häger A, Lundblad A, Svensson S. Increased excretion of a glucose-containing tetrasaccharide in the urine of a patient with glycogen storage disease type II (Pompe's disease). Eur J Clin Invest. 1974; 4(6):429-33.

Haltiwanger RS. Regulation of signal transduction pathways in development by glycosylation. Curr Opin Struct Biol. 2002; 12(5):593-8.

Hanisch FG, Jovanovic M, Peter-Katalinic J. Glycoprotein identification and localization of O-glycosylation sites by mass spectrometric analysis of deglycosylated/alkylaminylated peptide fragments. Anal Biochem. 2001; 290(1):47-59.

Hansen JE, Lund O, Tolstrup N, Gooley AA, Williams KL, Brunak S. NetOglyc: prediction of mucin type O-glycosylation sites based on sequence context and surface accessibility. Glycoconj J. 1998; 15(2):115-30.

Hansske B, Thiel C, Lübke T, Hasilik M, Höning S, Peters V, Heidemann PH, Hoffmann GF, Berger EG, von Figura K, Körner C. Deficiency of UDP-galactose:N-acetylglucosamine beta-1,4-galactosyltransferase I causes the congenital disorder of glycosylation type IId. J Clin Invest. 2002; 109(6):725-33.

Haraguchi M, Yamashiro S, Furukawa K, Takamiya K, Shiku H, Furukawa K. The effects of the site-directed removal of N-glycosylation sites from beta-1,4-N-acetylgalactosaminyltransferase on its function. Biochem J. 1995; 312 :273-80.

Harris RJ, Leonard CK, Guzzetta AW, Spellman MW. Tissue plasminogen activator has an O-linked fucose attached to threonine-61 in the epidermal growth factor domain. Biochemistry. 1991; 30(9):2311-4.

Harris RJ, Ling VT, Spellman MW. O-linked fucose is present in the first epidermal growth factor domain of factor XII but not protein C. J Biol Chem. 1992; 267(8):5102-7.

Harris RJ, Spellman MW. O-linked fucose and other post-translational modifications unique to EGF modules. Glycobiology. 1993; 3(3):219-24.

Harrison HH, Miller KL, Harbison MD, Slonim AE. Multiple serum protein abnormalities in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome: pathognomonic finding of two-dimensional electrophoresis? Clin Chem. 1992; 38(7):1390-2.

Hart GW, Housley MP, Slawson C. Cycling of O-linked beta-N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins. Nature. 2007; 446(7139):1017-22.

Harvey DJ. Structural determination of N-linked glycans by matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization mass spectrometry. Proteomics. 2005; 5(7):1774-86.

Hase S. High-performance liquid chromatography of pyridylaminated saccharides. Methods Enzymol. 1994; 230:225-37.

Haselbeck A, Hösel W. Immunological detection of glycoproteins on blots based on labeling with digoxigenin. Methods Mol Biol. 1993;14:161-73.

Haselberg R, de Jong GJ, Somsen GW. Capillary electrophoresis-mass spectrometry for the analysis of intact proteins. J Chromatogr A. 2007; 1159(1-2):81-109.

Hebert DN, Garman SC, Molinari M. The glycan code of the endoplasmic reticulum: asparagine-linked carbohydrates as protein maturation and quality-control tags. Trends Cell Biol. 2005; 15(7):364-70.

Hebert DN, Molinari M. In and out of the ER: protein folding, quality control, degradation, and related human diseases. Physiol Rev. 2007; 87(4):1377-408.

Heikinheimo P, Helland R, Leiros HK, Leiros I, Karlsen S, Evjen G, Ravelli R, Schoehn G, Ruigrok R, Tollersrud OK, McSweeney S, Hough E. The structure of bovine lysosomal alphamannosidase suggests a novel mechanism for low-pH activation. J Mol Biol. 2003; 327(3):631-44. Helenius J, Aebi M. Transmembrane movement of dolichol linked carbohydrates during Nglycoprotein biosynthesis in the endoplasmic reticulum. Semin Cell Dev Biol. 2002; 13(3):171-8.

Helenius A, Aebi M.Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. Annu Rev Biochem. 2004; 73:1019-49.

Helenius J, Ng DT, Marolda CL, Walter P, Valvano MA, Aebi M. Translocation of lipidlinked oligosaccharides across the ER membrane requires Rft1 protein. Nature. 2002; 415(6870):447-50.

Hellerqvist CG. Linkage analysis using Lindberg method. Methods Enzymol. 1990; 193:554-73.

Henrissat B, Bairoch A. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. Biochem J. 1993; 293 (Pt 3):781-8.

Henry MD, Campbell KP. Dystroglycan inside and out. Curr Opin Cell Biol. 1999; 11(5):602-7.

Hepbildikler ST, Sandhoff R, Kolzer M, Proia RL, Sandhoff K. Physiological substrates for human lysosomal beta -hexosaminidase S. J Biol Chem. 2002; 277(4):2562-72.

Hillebrand G, Schneppenheim R, Oldigs HD, Santer R. Hereditary fructose intolerance and alpha(1) antitrypsin deficiency. Arch Dis Child. 2000; 83(1):72-3.

Hirabayashi J. Lectin-based structural glycomics: glycoproteomics and glycan profiling. Glycoconj J. 2004; 21(1-2):35-40.

Hirao K, Natsuka Y, Tamura T, Wada I, Morito D, Natsuka S, Romero P, Sleno B, Tremblay LO, Herscovics A, Nagata K, Hosokawa N. EDEM3, a soluble EDEM homolog, enhances glycoprotein endoplasmic reticulum-associated degradation and mannose trimming. J Biol Chem. 2006; 281(14):9650-8.

Hirsch C, Blom D, Ploegh HL. A role for N-glycanase in the cytosolic turnover of glycoproteins. EMBO J. 2003; 22(5):1036-46.

Hirschberg CB. Transporters of nucleotide sugars, nucleotide sulfate and ATP in the Golgi apparatus membrane: where next? Glycobiology. 1997; 7(2):169-71.

Hofsteenge J, Blommers M, Hess D, Furmanek A, Miroshnichenko O. The four terminal components of the complement system are C-mannosylated on multiple tryptophan residues. J Biol Chem. 1999; 274(46):32786-94.

Hofsteenge J, Huwiler KG, Macek B, Hess D, Lawler J, Mosher DF, Peter-Katalinic J. Cmannosylation and O-fucosylation of the thrombospondin type 1 module. J Biol Chem. 2001; 276(9):6485-98.

Hofsteenge J, Muller DR, de Beer T, Loffler A, Richter WJ, Vliegenthart JF. New type of linkage between a carbohydrate and a protein: C-glycosylation of a specific tryptophan residue in human RNase Us. Biochemistry. 1994; 33(46):13524-30.

Hogan JM, Pitteri SJ, Chrisman PA, McLuckey SA. Complementary structural information from a tryptic N-linked glycopeptide via electron transfer ion/ion reactions and collision-induced dissociation. J Proteome Res. 2005; 4(2):628-32.

Hoja-Lukowicz D, Ciołczyk D, Bergquist J, Lityńska A, Laidler P. High-mannose-type oligosaccharides from human placental arylsulfatase A are core fucosylated as confirmed by MALDI MS. Glycobiology. 2000; 10(6):551-7.

Hommes FA, Varghese M. High-performance liquid chromatography of urinary oligosaccharides in the diagnosis of glycoprotein degradation disorders. Clin Chim Acta. 1991; 203(2-3):211-24.

Hosokawa N, Wada I, Hasegawa K, Yorihuzi T, Tremblay LO, Herscovics A, Nagata K. A novel ER alpha-mannosidase-like protein accelerates ER-associated degradation. EMBO Rep. 2001; 2(5):415-22.

Howard DR, Natowicz M, Baenziger JU. Structural studies of the endoglycosidase H-resistant oligosaccharides present on human beta-glucuronidase. J Biol Chem. 1982; 257(18):10861-8.

Huang Y, Mechref Y, Novotny MV. Microscale nonreductive release of O-linked glycans for subsequent analysis through MALDI mass spectrometry and capillary electrophoresis. Anal Chem. 2001; 73(24):6063-9.

Huizing M, Rakocevic G, Sparks SE, Mamali I, Shatunov A, Goldfarb L, Krasnewich D, Gahl WA, Dalakas MC. Hypoglycosylation of alpha-dystroglycan in patients with hereditary IBM due to GNE mutations. Mol Genet Metab. 2004; 81(3):196-202.

Humbel R, Collart M. Oligosaccharides in urine of patients with glycoprotein storage diseases. I. Rapid detection by thin-layer chromatography. Clin Chim Acta. 1975; 60(2):143-5.

Huttunen JK, Maury P, Miettinen TA. Increased urinary excretion of neuraminic acidcontaining oligosaccharides after myocardial infarction. J Mol Cell Cardiol. 1972; 4(1):59-70.

## I

Ioffe E, Stanley P. Mice lacking N-acetylglucosaminyltransferase I activity die at midgestation, revealing an essential role for complex or hybrid N-linked carbohydrates. Proc Natl Acad Sci USA. 1994; 91(2):728-32.

Iolascon A, Miraglia del Giudice E, Perrotta S, Granatiero M, Zelante L, Gasparini P. Exclusion of three candidate genes as determinants of congenital dyserythropoietic anemia type II (CDA-II). Blood. 1997 15; 90(10):4197-200.

Irie F, Murakoshi H, Suzuki T, Suzuki Y, Kon K, Ando S, Yoshida K, Hirabayashi Y. Characterization of four monosialo and a novel disialo Asn N-glycosides from the urine of a patient with aspartylglycosaminuria. Glycoconj J. 1995; 12(3):290-7.

#### J

Jacob GS, Scudder P. Glycosidases in structural analysis. Methods Enzymol. 1994; 230:280-99.

Jaeken J. Komrower Lecture. Congenital disorders of glycosylation (CDG): it's all in it! J Inherit Metab Dis. 2003; 26(2-3):99-118

Jaeken J, Matthijs G. Congenital disorders of glycosylation. Annu Rev Genomics Hum Genet. 2001;2:129-51.

Jaeken J, Matthijs G. Congenital disorders of glycosylation: a rapidly expanding disease family. Annu Rev Genomics Hum Genet. 2007; 8:261-78.

Jaeken J, Pirard M, Adamowicz M, Pronicka E, van Schaftingen E. Inhibition of phosphomannose isomerase by fructose 1-phosphate: an explanation for defective N-glycosylation in hereditary fructose intolerance. Pediatr Res. 1996; 40(5):764-6.

Jeppsson JO, Kristensson H, Fimiani C. Carbohydrate-deficient transferrin quantified by HPLC to determine heavy consumption of alcohol. Clin Chem. 1993; 39(10):2115-20.

Johnson RS, Martin SA, Biemann K, Stults JT, Watson JT. Novel fragmentation process of peptides by collision-induced decomposition in a tandem mass spectrometer: differentiation of leucine and isoleucine. Anal Chem. 1987; 59(21):2621-5.

Jones MZ, Laine RA. Caprine oligosaccharide storage disease. Accumulation of betamannosyl (1 goes to 4) beta-N-acetylglucosaminyl (1 goes to 4) beta-N-acetylglucosamine in brain. J Biol Chem. 1981; 256(10):5181-84.

Jones MZ, Dawson G. Caprine beta-mannosidosis. Inherited deficiency of beta-Dmannosidase. J Biol Chem. 1981; 256(10):5185-8.

Jones J, Krag SS, Betenbaugh MJ. Controlling N-linked glycan site occupancy. Biochim Biophys Acta. 2005;1726(2):121-37.

Ju T, Cummings RD. A unique molecular chaperone Cosmc required for activity of the mammalian core 1 beta 3-galactosyltransferase. Proc Natl Acad Sci USA. 2002; 99(26):16613-8.

Ju T, Cummings RD. Protein glycosylation: chaperone mutation in Tn syndrome. Nature. 2005; 437(7063):1252.

Julenius K, Molgaard A, Gupta R, Brunak S. Prediction, conservation analysis, and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites. Glycobiology. 2005; 15(2):153-64.

# K

Kamerling JP, Strecker G, Farriaux JP, Dorland L, Haverkamp J, Vliegenthart JF. 2-Acetamidoglucal, a new metabolite isolated from the urine of a patient with sialuria. Biochim Biophys Acta. 1979; 583(3):403-8.

Kanzaki T, Yokota M, Mizuno N, Matsumoto Y, Hirabayashi Y. Novel lysosomal glycoaminoacid storage disease with angiokeratoma corporis diffusum. Lancet. 1989; 1(8643):875-7

Kao YH, Lee GF, Wang Y, Starovasnik MA, Kelley RF, Spellman MW, Lerner L. The effect of O-fucosylation on the first EGF-like domain from human blood coagulation factor VII. Biochemistry. 1999; 38(22):7097-110.

Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. Anal Chem. 1988; 60(20):2299-301.

Kehry M, Sibley C, Fuhrman J, Schilling J, Hood LE. Amino acid sequence of a mouse immunoglobulin mu chain. Proc Natl Acad Sci USA. 1979; 76(6):2932-6.

Keir G, Winchester BG, Clayton P. Carbohydrate-deficient glycoprotein syndromes: inborn errors of protein glycosylation. Ann Clin Biochem. 1999; 36 (Pt 1):20-36.

Kelleher DJ, Gilmore R. An evolving view of the eukaryotic oligosaccharyltransferase. Glycobiology. 2006; 16(4):47R-62R.

Kim S, Hwang SK, Dwek RA, Rudd PM, Ahn YH, Kim EH, Cheong C, Kim SI, Park NS, Lee SM. Structural determination of the N-glycans of a lepidopteran arylphorin reveals the presence of a monoglucosylated oligosaccharide in the storage protein. Glycobiology. 2003; 13(3):147-57.

Kimura Y, Hess D, Sturm A. The N-glycans of jack bean alpha-mannosidase. Structure, topology and function. Eur J Biochem. 1999; 264(1):168-75.

Kin NM, Wolfe LS. High-performance liquid chromatographic analysis of oligosaccharides and glycopeptides accumulating in lysosomal storage disorders. Anal Biochem. 1980; 102(1):213-9.

Kornfeld S. Trafficking of lysosomal enzymes. FASEB J. 1987; 1(6):462-8.

Kornfeld S, Mellman I. The biogenesis of lysosomes. Annu Rev Cell Biol. 1989; 5:483-525.

Kornfeld R, Kornfeld S. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. Annu Rev Biochem. 1985; 54:631-64.

Kozutsumi Y, Nakao Y, Teramura T, Kawasaki T, Yamashina I, Mutsaers JH, van Halbeek H, Vliegenthart JF. Structures of oligomannoside chains of alpha-mannosidase from porcine kidney. J Biochem. 1986; 99(4):1253-65.

Krasnewich D, Gahl WA. Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome. Adv Pediatr. 1997; 44:109-40.

Krieg J, Glasner W, Vicentini A, Doucey MA, Loffler A, Hess D, Hofsteenge J. C-Mannosylation of human RNase 2 is an intracellular process performed by a variety of cultured cells. J Biol Chem. 1997; 272(42):26687-92.

Kumar TS, Scott JX, Raghupathy P, Moses PD. Mucolipidosis II (I - cell disease). J Postgrad Med. 2005; 51(3):232-3.

Küster B, Mann M. <sup>18</sup>O-labeling of N-glycosylation sites to improve the identification of gelseparated glycoproteins using peptide mass mapping and database searching. Anal Chem. 1999; 71(7):1431-40.

Küster B, Krogh TN, Mørtz E, Harvey DJ. Glycosylation analysis of gel-separated proteins. Proteomics. 2001; 1(2):350-61.

Küster B, Wheeler SF, Hunter AP, Dwek RA, Harvey DJ. Sequencing of N-linked oligosaccharides directly from protein gels: in-gel deglycosylation followed by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry and normal-phase high-performance liquid chromatography. Anal Biochem. 1997; 250(1):82-101.

# L

Lacey JM, Bergen HR, Magera MJ, Naylor S, O'Brien JF. Rapid determination of transferrin isoforms by immunoaffinity liquid chromatography and electrospray mass spectrometry. Clin Chem. 2001; 47(3):513-8.

Lai K, Langley SD, Khwaja FW, Schmitt EW, Elsas LJ. GALT deficiency causes UDPhexose deficit in human galactosemic cells. Glycobiology. 2003; 13(4):285-94.

Laine RA. A calculation of all possible oligosaccharide isomers both branched and linear yields  $1.05 \times 10(12)$  structures for a reducing hexasaccharide: the Isomer Barrier to development of single-method saccharide sequencing or synthesis systems. Glycobiology. 1994; 4(6):759-67.

Lake BD, Young EP, Winchester BG. Prenatal diagnosis of lysosomal storage diseases. Brain Pathol. 1998; 8(1):133-49.

Lakshman MR, Rao MN, Marmillot P. Alcohol and molecular regulation of protein glycosylation and function. Alcohol. 1999; (3):239-47.

Lamari FN, Kuhn R, Karamanos NK. Derivatization of carbohydrates for chromatographic, electrophoretic and mass spectrometric structure analysis. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2003; 793(1):15-36.

Lanz C, Kuhn M, Deiss V, Thormann W. Improved capillary electrophoresis method for the determination of carbohydrate-deficient transferrin in patient sera. Electrophoresis. 2004; 25(14):2309-18

Larsson A, Flodin M, Kollberg H. Increased serum concentrations of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) in patients with cystic fibrosis. Ups J Med Sci. 1998; 103(3):231-6.

Lattová E, Snovida S, Perreault H, Krokhin O. Influence of the labeling group on ionization and fragmentation of carbohydrates in mass spectrometry. J Am Soc Mass Spectrom. 2005; 16(5):683-96.

Lin AI, Philipsberg GA, Haltiwanger RS. Core fucosylation of high-mannose-type oligosaccharides in GlcNAc transferase I-deficient (Lec1) CHO cells. Glycobiology. 1994; 4(6):895-901.

Lis H, Sharon N. Protein glycosylation. Structural and functional aspects. Eur J Biochem. 1993; 218(1):1-27.

Liu WK, Young JD, Ward DN. Deglycosylated ovine lutropin: preparation and characterization by in vitro binding and steroidogenesis. Mol Cell Endocrinol. 1984; 37(1):29-39.

Lönnqvist L, Karttunen L, Rantamäki T, Kielty C, Raghunath M, Peltonen L. A point mutation creating an extra N-glycosylation site in fibrillin-1 results in neonatal Marfan syndrome. Genomics. 1996 15;36(3):468-75.

Lowe JB, Marth JD. A genetic approach to Mammalian glycan function. Annu Rev Biochem. 2003; 72:643-91.

Lundblad A. Oligosaccharides from human urine. Methods Enzymol. 1978; 50:226-35.

Lundblad A, Masson PK, Nordén NE. Structural determination of three glycoasparagines isolated from the urine of a patient with aspartylglycosaminuria. Eur J Biochem. 1976; 67(1):209-14.

Lundblad A, Svensson S. Letters: The structure of a urinary difucosyl pentasaccharide, characteristic of secretors with the blood-group A gene. Carbohydr Res. 1973; 30(1):187-9.

# Μ

Malagolini N, Dall'Olio F, Serafini-Cessi F, Cessi C. Effect of acute and chronic ethanol administration on rat liver alpha 2,6-sialyltransferase activity responsible for sialylation of serum transferrin. Alcohol Clin Exp Res. 1989; 13(5):649-53.

Maley F, Trimble RB, Tarentino AL, Plummer TH Jr. Characterization of glycoproteins and their associated oligosaccharides through the use of endoglycosidases. Anal Biochem. 1989; 180(2):195-204.

Malhotra R, Wormald MR, Rudd PM, Fischer PB, Dwek RA, Sim RB. Glycosylation changes of IgG associated with rheumatoid arthritis can activate complement via the mannose-binding protein. Nat Med. 1995; 1(3):237-43. Erratum in: Nat Med 1995; 1(6):599.

Malm D, Halvorsen DS, Tranebjaerg L, Sjursen H. Immunodeficiency in alpha-mannosidosis: a matched case-control study on immunoglobulins, complement factors, receptor density, phagocytosis and intracellular killing in leucocytes. Eur J Pediatr. 2000; 159(9):699-703.

Marklová E, Albahri Z. Screening and diagnosis of congenital disorders of glycosylation. Clin Chim Acta. 2007; 385(1-2):6-20.

Marquardt T, Denecke J. Congenital disorders of glycosylation: review of their molecular bases, clinical presentations and specific therapies. Eur J Pediatr. 2003; 162(6):359-79.

Marionneau S, Cailleau-Thomas A, Rocher J, Le Moullac-Vaidye B, Ruvoen N, Clement M, Le Pendu J. ABH and Lewis histo-blood group antigens, a model for the meaning of oligosaccharide diversity in the face of a changing world. Biochimie. 2001; 83(7):565-73.

Martin A, Rambal C, Berger V, Perier S, Louisot P. Availability of specific sugars for glycoconjugate biosynthesis: a need for further investigations in man. Biochimie. 1998; 80(1):75-86.

Martinez-Duncker I, Dupré T, Piller V, Piller F, Candelier JJ, Trichet C, Tchernia G, Oriol R, Mollicone R. Genetic complementation reveals a novel human congenital disorder of glycosylation of type II, due to inactivation of the Golgi CMP-sialic acid transporter. Blood. 2005; 105(7):2671-6.

Martinez T, Pace D, Brady L, Gerhart M, Balland A. Characterization of a novel modification on IgG2 light chain. Evidence for the presence of O-linked mannosylation. J Chromatogr A. 2007; 1156(1-2):183-7.

Mason RW. Lysosomal metabolism of proteins. In Lloyd JB and Mason RW (eds.) Subcellular biochemistry : biology of the lysosome. New York. 1996; (27)159-190.

Matsuura F, Jones MZ, Frazier SE. Structural analysis of the major caprine beta-mannosidosis urinary oligosaccharides. Biochim Biophys Acta. 1983; 759(1-2):67-73.

Matsuura F, Nunez HA, Grabowski GA, Sweeley CC. Structural studies of urinary oligosaccharides from patients with mannosidosis. Arch Biochem Biophys. 1981; 207(2):337-52.

Maury CP. Aspartylglycosaminuria: an inborn error of glycoprotein catabolism. J Inherit Metab Dis. 1982; 5(4):192-6.

Maury P. Quantitative determination of 4-N-2-acetamido-2-deoxy-beta-D-glucopyranosyl-Lasparagine in the urine of patients with aspartylglycosaminuria by gas-liquid chromatography. J Lab Clin Med. 1979; 93(5):718-23.

Maury CP, Sjöblom C, Wegelius O. Urinary excretion of sialic acid-containing saccharides in systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum. 1981; 24(9):1137-41.

Maury CP, Teppo AM, Wegelius O. Relationship between urinary sialylated saccharides, serum amyloid A protein, and C-reactive protein in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. Ann Rheum Dis. 1982; 41(3):268-71.

Mechref Y, Novotny MV. Mass spectrometric mapping and sequencing of N-linked oligosaccharides derived from submicrogram amounts of glycoproteins. Anal Chem. 1998; 70(3):455-63.

Mechref Y, Novotny MV. Structural investigations of glycoconjugates at high sensitivity. Chem Rev. 2002; 102(2):321-69.

Mechref Y, Novotny MV, Krishnan C. Structural characterization of oligosaccharides using MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometry. Anal Chem. 2003; 75(18):4895-903.

Meikle PJ, Fietz MJ, Hopwood JJ. Diagnosis of lysosomal storage disorders: current techniques and future directions. Expert Rev Mol Diagn. 2004; 4(5):677-91.

Mellman I. Endocytosis and molecular sorting. Annu Rev Cell Dev Biol. 1996; 12:575-625.

Mi Y, Shapiro SD, Baenziger JU. Regulation of lutropin circulatory half-life by the mannose/N-acetylgalactosamine-4-SO4 receptor is critical for implantation in vivo. J Clin Invest. 2002; 109(2):269-76.

Michalski JC. Normal and pathological catabolism of glycoproteins. In: Montreuil J, Vliegenthart JFG, Schachter H, eds Glycoproteins and disease. Amsterdam: Elsevier Science BV 1996; 55–97.

Michalski JC, Klein A. Glycoprotein lysosomal storage disorders: alpha- and betamannosidosis, fucosidosis and alpha-N-acetylgalactosaminidase deficiency. Biochim Biophys Acta. 1999; 1455(2-3):69-84.

Michalski JC, Lemoine J, Wieruszeski JM, Fournet B, Montreuil J, Strecker G. Characterization of a novel type of chain-terminator Gal beta 1-6Gal beta 1-4)GlcNAc in an oligosaccharide related to N-glycosylated protein glycans isolated from GM1 the urine of patients with gangliosidosis. Eur J Biochem. 1991;198(2):521-6.

Michalski JC, Strecker G, Fournet B. Structures of sialyl-oligosaccharides excreted in the urine of a patient with mucolipidosis I. FEBS Lett. 1977; 79(1):101-4.

Michalski JC, Strecker G, van Halbeek H, Dorland L, Vliegenthart JF. The structures of six urinary oligosaccharides that are characteristic for a patient with Morquio syndrome type B. Carbohydr Res. 1982; 100:351-63.

Michalski JC, Wieruszeski JM, Alonso C, Cache P, Montreuil J, Strecker G. Characterization and 400-MHz 1H-NMR analysis of urinary fucosyl glycoasparagines in fucosidosis. Eur J Biochem. 1991; 201(2):439-58.

Mitra N, Sinha S, Ramya TN, Surolia A. N-linked oligosaccharides as outfitters for glycoprotein folding, form and function. Trends Biochem Sci. 2006; 31(3):156-63. Erratum in: Trends Biochem Sci. 2006; 31(5):251.

Molinari M, Helenius A. Chaperone selection during glycoprotein translocation into the endoplasmic reticulum. Science. 2000; 288(5464):331-3.

Molinari M, Calanca V, Galli C, Lucca P, Paganetti P. Role of EDEM in the release of misfolded glycoproteins from the calnexin cycle. Science. 2003; 299(5611):1397-400.

Moloney DJ, Panin VM, Johnston SH, Chen J, Shao L, Wilson R, Wang Y, Stanley P, Irvine KD, Haltiwanger RS, Vogt TF. Fringe is a glycosyltransferase that modifies Notch. Nature. 2000; 406(6794):369-75.

Monteiro RC, Kubagawa H, Cooper MD. Cellular distribution, regulation, and biochemical nature of an Fc alpha receptor in humans. J Exp Med. 1990; 171(3):597-613.

Montreuil J, Biserte G, Strecker G, Spik G, Fontaine G, Farriaux JP. [Description of a new type of melituria, called sialuria] Clin Chim Acta. 1968; 21(1):61-9

Moore SE, Bauvy C, Codogno P. Endoplasmic reticulum-to-cytosol transport of free polymannose oligosaccharides in permeabilized HepG2 cells.EMBO J. 1995; 14(23):6034-42.

Moore SE. Oligosaccharide transport: pumping waste from the ER into lysosomes. Trends Cell Biol. 1999; 9(11):441-6.

Morelle W, Canis K, Chirat F, Faid V, Michalski JC. The use of mass spectrometry for the proteomic analysis of glycosylation. Proteomics. 2006; 6(14):3993-4015.

Morelle W, Flahaut C, Michalski JC, Louvet A, Mathurin P, Klein A. Mass spectrometric approach for screening modifications of total serum N-glycome in human diseases: application to cirrhosis. Glycobiology. 2006; 16(4):281-93.

Morelle W, Slomianny MC, Diemer H, Schaeffer C, van Dorsselaer A, Michalski JC. Fragmentation characteristics of permethylated oligosaccharides using a matrix-assisted laser desorption/ionization two-stage time-of-flight (TOF/TOF) tandem mass spectrometer. Rapid Commun Mass Spectrom. 2004; 18(22):2637-49.

Morelle W, Slomianny MC, Diemer H, Schaeffer C, van Dorsselaer A, Michalski JC. Structural characterization of 2-aminobenzamide-derivatized oligosaccharides using a matrix-assisted laser desorption/ionization two-stage time-of-flight tandem mass spectrometer. Rapid Commun Mass Spectrom. 2005; 19(14):2075-84

Moremen KW, Trimble RB, Herscovics A. Glycosidases of the asparagine-linked oligosaccharide processing pathway. Glycobiology. 1994; 4(2):113-25

Mormann M, Paulsen H, Peter-Katalinić J. Electron capture dissociation of O-glycosylated peptides: radical site-induced fragmentation of glycosidic bonds. Eur J Mass Spectrom (Chichester, Eng). 2005; 11(5):497-511.

Morris HR, Paxton T, Panico M, McDowell R, Dell A. A novel geometry mass spectrometer, the Q-TOF, for low-femtomole/attomole-range biopolymer sequencing. J Protein Chem. 1997; 16(5):469-79.

#### N

Nakao Y, Kozutsumi Y, Kawasaki T, Yamashina I, Van Halbeek H, Vliegenthart JF. Oligosaccharides on cathepsin D from porcine spleen. Arch Biochem Biophys. 1984; 229(1):43-54.

Nemansky M, de Leeuw R, Wijnands RA, van den Eijnden DH. Enzymic remodelling of the N- and O-linked carbohydrate chains of human chorionic gonadotropin. Effects on biological activity and receptor binding. Eur J Biochem. 1995; 227(3):880-8.

Neufeld EF, Muenzer J. In Scriver CR, Beaudet, AL, Sly WS, and Valle D. The mucopolysaccharidoses. In Scriver CR, Beaudet, AL, Sly WS, and Valle D. Eds The metabolic and molecular bases of inherited disease, 8th ed McGraw-Hill, New York, 2001; 3421-3452.

Ng-Ying-Kin NM, Wolfe LS. Oligosaccharides accumulating in the liver from a patient with GM2-gangliosidosis variant O (Sandhoff-Jatzkewitz disease). Biochem Biophys Res Commun. 1974; 59(3):837-44.

Nilssen O, Berg T, Riise HM, Ramachandran U, Evjen G, Hansen GM, Malm D, Tranebjaerg L, Tollersrud OK. alpha-Mannosidosis: functional cloning of the lysosomal alphamannosidase cDNA and identification of a mutation in two affected siblings. Hum Mol Genet. 1997; 6(5):717-26.

Nishigaki M, Yamashita K, Matsuda I, Arashima S, Kobata A. Urinary oligosaccharides of fucosidosis. Evidence of the occurrence of X-antigenic determinant in serum-type sugar chains of glycoproteins. J Biochem. 1978; 84(4):823-34.

Nishimura H, Kawabata S, Kisiel W, Hase S, Ikenaka T, Takao T, Shimonishi Y, Iwanaga S. Identification of a disaccharide (Xyl-Glc) and a trisaccharide (Xyl2-Glc) O-glycosidically linked to a serine residue in the first epidermal growth factor-like domain of human factors VII and IX and protein Z and bovine protein Z. J Biol Chem. 1989; 264(34):20320-5.

Noda K, Miyoshi E, Uozumi N, Yanagidani S, Ikeda Y, Gao C, Suzuki K, Yoshihara H, Yoshikawa K, Kawano K, Hayashi N, Hori M, Taniguchi N. Gene expression of alpha1-6 fucosyltransferase in human hepatoma tissues: a possible implication for increased fucosylation of alpha-fetoprotein. Hepatology. 1998; 28(4):944-52. Erratum in: Hepatology 1999; 29(1):301.

Nordén NE, Lundblad A, Svensson S, Ockerman PA, Autio S. A mannose-containing trisaccharide isolated from urines of three patients with mannosidosis. J Biol Chem. 1973; 248(17):6210-5

## 0

Ockerman PA. A generalized storage disorder resembling Hurler's syndrome. Lancet II. 1967; 239-241.

Oefner PJ, Chiesa C. Capillary electrophoresis of carbohydrates. Glycobiology. 1994; 4(4):397-412.

Oka T, Ungar D, Hughson FM, Krieger M. The COG and COPI complexes interact to control the abundance of GEARs, a subset of Golgi integral membrane proteins. Mol Biol Cell. 2004; 15(5):2423-35.

Orczyk-Pawilowicz M. The role of fucosylation of glycoconjugates in health and disease. Postepy Hig Med Dosw. 2007; 61:240-52.

#### P

Papac DI, Wong A, Jones AJ. Analysis of acidic oligosaccharides and glycopeptides by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Anal Chem. 1996; 68(18):3215-23.

Parekh RB, Dwek RA, Sutton BJ, Fernandes DL, Leung A, Stanworth D, Rademacher TW, Mizuochi T, Taniguchi T, Matsuta K, et al. Association of rheumatoid arthritis and primary osteoarthritis with changes in the glycosylation pattern of total serum IgG. Nature. 1985; 316(6027):452-7.

Park EI, Mi Y, Unverzagt C, Gabius HJ, Baenziger JU. The asialoglycoprotein receptor clears glycoconjugates terminating with sialic acid alpha 2,6GalNAc. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005; 102(47):17125-9.

Paschke E, Gruber W, Ring E, Sperl W. Storage material from urine and tissues in the nephropathic phenotype of infantile sialic acid storage disease. J Inherit Metab Dis. 1992; 15(1):47-56

Peelen GO, de Jong JG, Wevers RA. HPLC analysis of oligosaccharides in urine from oligosaccharidosis patients. Clin Chem. 1994; 40(6):914-21.

Percheron F, Foglietti MJ, Bernard M, Ricard B. Mammalian beta-D-mannosidase and betamannosidosis. Biochimie. 1992; 74(1):5-11.

Peter-Katalinić J. Methods in enzymology: O-glycosylation of proteins. Methods Enzymol. 2005; 405:139-71.

Petrescu AJ, Milac AL, Petrescu SM, Dwek RA, Wormald MR. Statistical analysis of the protein environment of N-glycosylation sites: implications for occupancy, structure, and folding. Glycobiology. 2004;14(2):103-14.

Pisitkun T, Johnstone R, Knepper MA. Discovery of urinary biomarkers. Mol Cell Proteomics. 2006; 5(10):1760-71.

Plemper RK, Wolf DH. Retrograde protein translocation: ERADication of secretory proteins in health and disease. Trends Biochem Sci. 1999; 24(7):266-70.

Pohl S, Hoffmann A, Rüdiger A, Nimtz M, Jaeken J, Conradt HS. Hypoglycosylation of a brain glycoprotein (beta-trace protein) in CDG syndromes due to phosphomannomutase deficiency and N-acetylglucosaminyl-transferase II deficiency. Glycobiology. 1997; 7(8):1077-84.

Pohlmann R, Hasilik A, Cheng S, Pemble S, Winchester B, von Figura K. Synthesis of lysosomal alpha-mannosidase in normal and mannosidosis fibroblasts. Biochem Biophys Res Commun. 1983; 115(3):1083-9.

Pollitt RJ, Jenner FA.Enzymatic cleavage of 2-acetamido-1-(beta'-L-aspartamido)-1,2dideoxy-beta-D-glucose by human plasma and seminal fluid. Failure to detect the heterozygous state for aspartylglycosaminuria. Clin Chim Acta. 1969; 25(3):413-6

Pollitt RJ, Jenner FA, Merskey H. Aspartylglycosaminuria. An inborn error of metabolism associated with mental defect. Lancet. 1968; 2(7562):253-5.

Pollitt RJ, Pretty KM. The glycoasparagines in urine of a patient with aspartylglycosaminuria. Biochem J. 1974; 141(1):141-6.

Powell LD, Paneerselvam K, Vij R, Diaz S, Manzi A, Buist N, Freeze H, Varki A. Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome: not an N-linked oligosaccharide processing defect, but an abnormality in lipid-linked oligosaccharide biosynthesis? J Clin Invest. 1994; 94(5):1901-9.

Powell AK, Harvey DJ. Stabilization of sialic acids in N-linked oligosaccharides and gangliosides for analysis by positive ion matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom. 1996; 10(9):1027-32.

Prusiner SB. Biology and genetics of prion diseases. Annu Rev Microbiol. 1994; 48:655-86.

Pshezhetsky AV, Potier M. Association of N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase with the multienzyme lysosomal complex of beta-galactosidase, cathepsin A, and neuraminidase. Possible implication for intralysosomal catabolism of keratan sulfate. J Biol Chem. 1996; 271(45):28359-65.

# Q

Quentin E, Gladen A, Rodén L, Kresse H. A genetic defect in the biosynthesis of dermatan sulfate proteoglycan: galactosyltransferase I deficiency in fibroblasts from a patient with a progeroid syndrome. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990; 87(4):1342-6.

# R

Rabbani SA, Mazar AP, Bernier SM, Haq M, Bolivar I, Henkin J, Goltzman D. Structural requirements for the growth factor activity of the amino-terminal domain of urokinase. J Biol Chem. 1992; 267(20):14151-6.

Rabinovich GA, Riera CM, Landa CA, Sotomayor CE. Galectins: a key intersection between glycobiology and immunology. Braz J Med Biol Res. 1999; 32(4):383-93.

Rademacher TW, Parekh RB, Dwek RA, Isenberg D, Rook G, Axford JS, Roitt I. The role of IgG glycoforms in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. Springer Semin Immunopathol. 1988; 10(2-3):231-49.

Rademacher TW, Williams P, Dwek RA. Agalactosyl glycoforms of IgG autoantibodies are pathogenic. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994; 91(13):6123-7.

Rademaker GJ, Pergantis SA, Blok Tip L, Langridge JI, Kleen A, Thomas Oates JE. Mass spectrometric determination of the sites of O- glycan attachment with low picomolar sensitivity. Anal. Biochem. 1998; 257 : 149–160.

Raghunath M, Kielty CM, Steinmann B. Truncated profibrillin of a Marfan patient is of apparent similar size as fibrillin: intracellular retention leads to over-N-glycosylation. J Mol Biol. 1995 19; 248(5):901-9.

Rampal R, Luther KB, Haltiwanger RS. Notch signaling in normal and disease States: possible therapies related to glycosylation. Curr Mol Med. 2007; 7(4):427-45.

Ramsay SL, Maire I, Bindloss C, Fuller M, Whitfield PD, Piraud M, Hopwood JJ, Meikle PJ. Determination of oligosaccharides and glycolipids in amniotic fluid by electrospray ionisation tandem mass spectrometry: in utero indicators of lysosomal storage diseases. Mol Genet Metab. 2004; 83(3):231-8.

Reuser AJ, Kroos MA, Visser WJ, Willemsen R. Lysosomal storage diseases: cellular pathology, clinical and genetic heterogeneity, therapy. Ann Biol Clin (Paris). 1994; 52(10):721-8.

Rhim AD, Stoykova LI, Trindade AJ, Glick MC, Scanlin TF. Altered terminal glycosylation and the pathophysiology of CF lung disease. J Cyst Fibros. 2004; 3 Suppl 2:95-6.

Rip JW, Rupar CA, Ravi K, Carroll KK. Distribution, metabolism and function of dolichol and polyprenols. Prog Lipid Res. 1985; 24(4):269-309.

Roepstorff P, Fohlman J. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. Biomed Mass Spectrom. 1984; 11(11):601.

Rook G, Thompson S, Buckley M, Elson C, Brealey R, Lambert C, White T, Rademacher T. The role of oil and agalactosyl IgG in the induction of arthritis in rodent models. Eur J Immunol. 1991; 21(4):1027-32.

Royle L, Mattu TS, Hart E, Langridge JI, Merry AH, Murphy N, Harvey DJ, Dwek RA, Rudd PM. An analytical and structural database provides a strategy for sequencing O-glycans from microgram quantities of glycoproteins. Anal Biochem. 2002; 304(1):70-90.

Rudd PM, Colominas C, Royle L, Murphy N, Hart E, Merry AH, Hebestreit HF, Dwek RA. A high-performance liquid chromatography based strategy for rapid, sensitive sequencing of N-linked oligosaccharide modifications to proteins in sodium dodecyl sulphate polyacrylamide electrophoresis gel bands. Proteomics. 2001; 1(2):285-94.

Rudd PM, Dwek RA. Glycosylation: heterogeneity and the 3D structure of proteins. Crit Rev Biochem Mol Biol. 1997; 32(1):1-100.

Rudd PM, Guile GR, Küster B, Harvey DJ, Opdenakker G, Dwek RA. Oligosaccharide sequencing technology. Nature. 1997; 388(6638):205-7.

Rudd PM, Merry AH, Wormald MR, Dwek RA. Glycosylation and prion protein. Curr Opin Struct Biol. 2002; 12(5):578-86.

#### S

Sagi D, Peter-Katalinic J, Conradt HS, Nimtz M. Sequencing of tri- and tetraantennary Nglycans containing sialic acid by negative mode ESI QTOF tandem MS. J Am Soc Mass Spectrom. 2002; 13(9):1138-48.

Sakuraba H, Matsuzawa F, Aikawa S, Doi H, Kotani M, Nakada H, Fukushige T, Kanzaki T. Structural and immunocytochemical studies on alpha-N-acetylgalactosaminidase deficiency (Schindler/Kanzaki disease). J Hum Genet. 2004; 49(1):1-8.

Sandhoff K, Christomanou H. Biochemistry and genetics of gangliosidoses. Hum Genet. 1979; 50(2):107-43.

Sandra K, Devreese B, Van Beeumen J, Stals I, Claeyssens M. The Q-Trap mass spectrometer, a novel tool in the study of protein glycosylation. J Am Soc Mass Spectrom. 2004; 15(3):413-23

Satomi Y, Shimonishi Y, Takao T. N-glycosylation at Asn(491) in the Asn-Xaa-Cys motif of human transferrin. FEBS Lett. 2004; 576(1-2):51-56.

Schachter H. Biosynthetic controls that determine the branching and microheterogeneity of protein-bound oligosaccharides. Biochem Cell Biol. 1986; 64(3):163-81.

Schachter H. The joys of HexNAc. The synthesis and function of N- and O-glycan branches. Glycoconj J. 2000; 17(7-9):465-83.

Schachter H. The clinical relevance of glycobiology. J Clin Invest. 2001; 108(11):1579-82.

Schulz BL, Sloane AJ, Robinson LJ, Prasad SS, Lindner RA, Robinson M, Bye PT, Nielson DW, Harry JL, Packer NH, Karlsson NG. Glycosylation of sputum mucins is altered in cystic fibrosis patients. Glycobiology. 2007; 17(7):698-712.

Seppala R, Lehto VP, Gahl WA. Mutations in the human UDP-N-acetylglucosamine 2epimerase gene define the disease sialuria and the allosteric site of the enzyme. Am J Hum Genet. 1999; 64(6):1563-9.

Seppala R, Tietze F, Krasnewich D, Weiss P, Ashwell G, Barsh G, Thomas GH, Packman S, Gahl WA. Sialic acid metabolism in sialuria fibroblasts. J Biol Chem. 1991; 266(12):7456-61.

Seta N, Barnier A, Hochedez F, Besnard MA, Durand G. Diagnostic value of Western blotting in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome. Clin Chim Acta. 1996; 254(2):131-40.

Sewell AC. An improved thin-layer chromatographic method for urinary oligosaccharide screening. Clin Chim Acta. 1979; 92(3):411-4.

Shao L, Haltiwanger RS. O-fucose modifications of epidermal growth factor-like repeats and thrombospondin type 1 repeats: unusual modifications in unusual places. Cell Mol Life Sci. 2003; 60(2):241-50.

Shao L, Luo Y, Moloney DJ, Haltiwanger R. O-glycosylation of EGF repeats: identification and initial characterization of a UDP-glucose: protein O-glucosyltransferase.Glycobiology. 2002;12(11):763-70.

Sharon N, Lis H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. Glycobiology. 2004; 14(11):53R-62R.

Sheares BT, Robbins PW. Glycosylation of ovalbumin in a heterologous cell: analysis of oligosaccharide chains of the cloned glycoprotein in mouse L cells. Proc Natl Acad Sci USA. 1986; 83(7):1993-7.

Shimada I, Shoji M, Futatsuya R, Katoh T, Kominato Y, Sakamoto T, Fujikura T. Elevation of ratio of urinary N-acetylneuraminlactose to free sialic acid in some advanced cancer patients. J Gastroenterol. 1995; 30(1):21-7.

Silberstein S, Gilmore R. Biochemistry, molecular biology, and genetics of the oligosaccharyltransferase. FASEB J. 1996; 10(8):849-58.

Skoza L, Mohos S. Stable thiobarbituric acid chromophore with dimethyl sulphoxide. Application to sialic acid assay in analytical de-O-acetylation. Biochem J. 1976; 159(3):457-62.

Slavin RE, Wen J, Kumar D, Evans EB. Familial tumoral calcinosis. A clinical, histopathologic, and ultrastructural study with an analysis of its calcifying process and pathogenesis. Am J Surg Pathol. 1993; 17(8):788-802.

Smith PL, Baenziger JU. Molecular basis of recognition by the glycoprotein hormone-specific N-acetylgalactosamine-transferase. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992; 89(1):329-33.

Spiro RG. Glycoproteins. Adv Protein Chem. 1973;27:349-467.

Spiro RG. Role of N-linked polymannose oligosaccharides in targeting glycoproteins for endoplasmic reticulum-associated degradation. Cell Mol Life Sci. 2004; 61(9):1025-41.

Stahl PD, Ezekowitz RA. The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense. Curr Opin Immunol. 1998; 10(1):50-5.

Stankovics J, Molnár D, Burus I, Pintér Z. Infantile sialic acid storage disease diagnosed by gas chromatography-mass spectroscopy analyses of urine sample. J Inherit Metab Dis. 1997; 20(5):728-9.

Starr CM, Masada RI, Hague C, Skop E, Klock JC. Fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis in the separation, analysis, and sequencing of carbohydrates. J Chromatogr A. 1996; 720(1-2):295-321.

Stibler H, Borg S. Glycoprotein glycosyltransferase activities in serum in alcohol-abusing patients and healthy controls.Scand J Clin Lab Invest. 1991; 51(1):43-51.

Stibler H, Hultcrantz R. Carbohydrate-deficient transferrin in serum in patients with liver diseases. Alcohol Clin Exp Res. 1987; 11(5):468-73.

Stibler H, von Döbeln U, Kristiansson B, Guthenberg C. Carbohydrate-deficient transferrin in galactosaemia. Acta Paediatr. 1997; 86(12):1377-8.

Strecker G, Fournet B, Bouquelet S, Montreuil J, Dhondt JL, Farriaux JP. [Chemistry of urinary mannosides excreted in mannosidosis] Biochimie. 1976; 58(5):579-86

Strecker G, Fournet B, Montreuil J. Structure of the three major fucosyl-glycoasparagines accumulating in the urine of a patient with fucosidosis. Biochimie. 1978; 60(8):725-34.

Strecker G, Fournet B, Spik G, Montreuil J, Durand P, Tondeur M. [Structures of 9 oligosaccharides and glycopeptides containing large amounts of fucose excreted in the urine of 2 patients with fucosidosis] C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D. 1977; 284(1):85-8.

Strecker G, Herlant-Peers MC, Fournet B, Montreul J. Structure of seven oligosaccharides excreted in the urine of a patient with Sandhoff's disease (GM2 gangliosidosis-variant O). Eur J Biochem. 1977; 81(1):165-71.

Strecker G, Michalski JC. Sialidosis, a new type of inborn disease. Curr Probl Clin Biochem. 1979; (9):370-82.

Strecker G, Michalski JC, Montreuil J, Farriaux JP. Deficit in neuraminidase associated with mucolipidosis II (I-cell disease). Biomedicine. 1976; 25(7):238-40.

Strecker G, Peers MC, Michalski JC, Hondi-Assah T, Fournet B, Spik G, Montreuil J, Farriaux JP, Maroteaux P, Durand P. Structure of nine sialyl-oligosaccharides accumulated in urine of eleven patients with three different types of sialidosis. Mucolipidosis II and two new types of mucolipidosis. Eur J Biochem. 1977; 75(2):391-403

Sturiale L, Barone R, Fiumara A, Perez M, Zaffanello M, Sorge G, Pavone L, Tortorelli S, O'Brien JF, Jaeken J, Garozzo D. Hypoglycosylation with increased fucosylation and branching of serum transferrin N-glycans in untreated galactosemia. Gycobiology. 2005; 15(12):1268-76.

Sugahara K, Funakoshi S, Funakoshi I, Alla P, Yamashina I. Characterization of one neutral and two acidic glycoasparagines isolated from the urine of patients with aspartylglycosylaminuria (AGU). J Biochem. 1976; 80(2):195-201.

Sugahara K, Funakoshi S, Funakoshi I, Aula P, Yamashina I. Characterization of two glycoasparagines isolated from the urine of patients with aspartylglycosylaminuria (AGU). J Biochem. 1975; 78(4):673-8.

Suzuki T, Funakoshi Y. Free N-linked oligosaccharide chains: formation and degradation. Glycoconj J. 2006; 23(5-6):291-302.

Suzuki T, Park H, Lennarz WJ. Cytoplasmic peptide:N-glycanase (PNGase) in eukaryotic cells: occurrence, primary structure, and potential functions. FASEB J. 2002; 16(7):635-41.

#### Т

Tagliaro F, Bortolotti F, Zuliani M, Crivellente F, Manett G, Pascali VL, Marigo M. Carbohydrate-deficient transferrin determination revisited with capillary electrophoresis: a new biochemical marker of chronic alcohol abuse. J Capill Electrophor Microchip Technol. 1999; 6(5-6):137-43.

Tagliaro F, Crivellente F, Manetto G, Puppi I, Deyl Z, Marigo M. Optimized determination of carbohydrate-deficient transferrin isoforms in serum by capillary zone electrophoresis. Electrophoresis. 1998; 19(16-17):3033-9.

Takahashi Y, Nakamura Y, Yamaguchi S, Orii T. Urinary oligosaccharide excretion and severity of galactosialidosis and sialidosis. Clin Chim Acta. 1991; 203(2-3):199-210.

Takagaki K, Nakamura T, Endo M. Demonstration of an endo-beta-galactosidase and an endo-beta-xylosidase that degrade the proteoglycan linkage region. Biochim Biophys Acta. 1988; 966(1):94-8.

Takahashi T, Schmidt PG, Tang J. Oligosaccharide units of lysosomal cathepsin D from porcine spleen. Amino acid sequence and carbohydrate structure of the glycopeptides. J Biol Chem. 1983; 258(5):2819-30.

Takahashi T, Schmidt PG, Tang J. Novel carbohydrate structures of cathepsin B from porcine spleen. J Biol Chem. 1984; 259(10):6059-62.

Taniguchi N, Honke K, Fukuda M. Handbook of Glycosyltransferase and Related Genes. Springer, Tokyo. 2002.

Taniguchi T, Mizuochi T, Towatari T, Katunuma N, Kobata A. Structural studies on the carbohydrate moieties of rat liver cathepsins B and H. J Biochem. 1985; 97(3):973-6.

Tarentino AL, Plummer TH Jr. The first demonstration of a procaryotic glycosylasparaginase. Biochem Biophys Res Commun. 1993; 197(1):179-86.

Tarentino AL, Plummer TH Jr. Substrate specificity of Flavobacterium meningosepticum Endo F2 and endo F3: purity is the name of the game. Glycobiology. 1994; 4(6):771-3.

Tarentino AL, Plummer TH Jr. Enzymatic deglycosylation of asparagine-linked glycans: purification, properties, and specificity of oligosaccharide-cleaving enzymes from Flavobacterium meningosepticum. Methods Enzymol. 1994; 230:44-57

Taylor ME, Drickamer K. Structure-function analysis of C-type animal lectins. Methods Enzymol. 2003; 363:3-16.

Taylor AM, Holst O, Thomas-Oates J. Mass spectrometric profiling of O-linked glycans released directly from glycoproteins in gels using in-gel reductive beta-elimination. Proteomics. 2006; 6(10):2936-46

Ten Hagen KG, Fritz TA, Tabak LA. All in the family: the UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases. Glycobiology. 2003; 13(1):1R-16R.

Thanka Christlet TH, Veluraja K. Database analysis of O-glycosylation sites in proteins. Biophys J. 2001; 80(2):952-60.

Thiele H, Sakano M, Kitagawa H, Sugahara K, Rajab A, Höhne W, Ritter H, Leschik G, Nürnberg P, Mundlos S. Loss of chondroitin 6-O-sulfotransferase-1 function results in severe human chondrodysplasia with progressive spinal involvement. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004; 101(27):10155-60.

Thomas GH. Disorders of glycoprotein degradation:  $\alpha$ -mannosidosis,  $\beta$ -mannosidosis, fucosidosis, and sialidosis. In: Scriver SR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds The metabolic and molecular basis of inherited disease, McGraw-Hill, London 2001; 3507–33.

Thomas GH, Scocca J, Miller CS, Reynolds L. Evidence for non-lysosomal storage of N-acetylneuraminic acid (sialic acid) in sialuria fibroblasts. Clin Genet. 1989; 36(4):242-9

Tollersrud OK, Berg T, Healy P, Evjen G, Ramachandran U, Nilssen O. Purification of bovine lysosomal alpha-mannosidase, characterization of its gene and determination of two mutations that cause alpha-mannosidosis. Eur J Biochem. 1997; 246(2):410-9.

Tondeur M, Libert J, Vamos E, Van Hoof F, Thomas GH, Strecker G. Infantile form of sialic acid storage disorder: clinical, ultrastructural, and biochemical studies in two siblings. Eur J Pediatr. 1982; 139(2):142-7.

Tondeur M, Vamos-Hurwitz E, Mockel-Pohl S, Dereume JP, Cremer N, Loeb H. Clinical, biochemical, and ultrastructural studies in a case of chondrodystrophy presenting the I-cell phenotype in tissue culture. J Pediatr. 1971; 79(3):366-78.

Trombetta ES, Parodi AJ. Quality control and protein folding in the secretory pathway. Annu Rev Cell Dev Biol. 2003; 19:649-76.

Tsai B, Ye Y, Rapoport TA. Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol. Nat Rev Mol Cell Biol. 2002; 3(4):246-55.

Tsuji A, Suzuki Y. Purification of human placental acid alpha-mannosidase by an immunological method. Biochem Int. 1987; 15(3):483-9.

Turnpenny PD, Alman B, Cornier AS, Giampietro PF, Offiah A, Tassy O, Pourquié O, Kusumi K, Dunwoodie S. Abnormal vertebral segmentation and the notch signaling pathway in man. Dev Dyn. 2007; 236(6):1456-74.

#### U

Ungar D, Oka T, Krieger M, Hughson FM. Retrograde transport on the COG railway. Trends Cell Biol. 2006; 16(2):113-20.

#### V

Vaith P, Assmann G, Uhlenbruck G. Characterization of the oligosaccharide side chain of apolipoprotein C-III from human plasma very low density lipoproteins. Biochim Biophys Acta. 1978; 541(2):234-40.

van den Steen P, Rudd PM, Dwek RA, Opdenakker G. Concepts and principles of O-linked glycosylation. Crit Rev Biochem Mol Biol. 1998; 33(3):151-208

van Diggelen OP, Schindler D, Kleijer WJ, Huijmans JM, Galjaard H, Linden HU, Peter-Katalinic J, Egge H, Dabrowski U, Cantz M. Lysosomal alpha-N-acetylgalactosaminidase deficiency: a new inherited metabolic disease. Lancet. 1987; 2(8562):804.

van Halbeek H, Dorland L, Veldink GA, Vliegenthart JF, Strecker G, Michalski JC, Montreuil J, Hull WE. A 500 MHz 1H NMR study of urinary oligosaccharides from patients with mannosidosis. FEBS Lett. 1980; 121(1):71-7

van Pelt J, Dorland L, Duran M, Hokke CH, Kamerling JP, Vliegenthart JF. Sialyl-alpha 2-6mannosyl-beta 1-4-N-acetylglucosamine, a novel compound occurring in urine of patients with beta-mannosidosis. J Biol Chem. 1990; 265(32):19685-9.

van Pelt J, Hård K, Kamerling JP, Vliegenthart JF, Reuser AJ, Galjaard H. Isolation and structural characterization of twenty-one sialyloligosaccharides from galactosialidosis urine. An intact N,N'-diacetylchitobiose unit at the reducing end of a diantennary structure. Biol Chem Hoppe Seyler. 1989; 370(3):191-203.

van Pelt J, Hokke CH, Dorland L, Duran M, Kamerling JP, Vliegenthart JF. Accumulation of mannosyl-beta(1----4)-N-acetylglucosamine in fibroblasts and leukocytes of patients with a deficiency of beta-mannosidase. Clin Chim Acta. 1990; 187(1):55-60.

van Pelt J, Kamerling JP, Bakker HD, Vliegenthart JF. A comparative study of sialyloligosaccharides isolated from sialidosis and galactosialidosis urine. J Inherit Metab Dis. 1991;14(5):730-40.

van Pelt J, Kamerling JP, Vliegenthart JF, Verheijen FW, Galjaard H. Isolation and structural characterization of sialic acid-containing storage material from mucolipidosis I (sialidosis) fibroblasts. Biochim Biophys Acta. 1988; 965(1):36-45.

van Pelt J, van Bilsen DG, Kamerling JP, Vliegenthart JF. Structural analysis of O-glycosidic type of sialyloligosaccharide-alditols derived from urinary glycopeptides of a sialidosis patient. Eur J Biochem. 1988; 174(1):183-7.

Van Pelt J, Van Kuik JA, Kamerling JP, Vliegenthart JF, Van Diggelen OP, Galjaard H. Storage of sialic acid-containing carbohydrates in the placenta of a human galactosialidosis fetus. Isolation and structural characterization of 16 sialyloligosaccharides. Eur J Biochem. 1988; 177(2):327-38.

Varki A. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct.Glycobiology. 1993; 3(2):97-130.

Varki A, Angata T. Siglecs--the major subfamily of I-type lectins. Glycobiology. 2006; 16(1):1R-27R.

Varki A, Cummings R, Esko J, Freeze H, Hart G, Marth J. Essentials of glycobiology. Cold Spring Harbor–New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999.

Vellodi A. Bone marrow transplantation for lysosomal storage disorders. Expert Review of Endocrinology and Metabolism. 2006; 1(3):425-438.

Venkatachalam KV. Human 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) synthase: biochemistry, molecular biology and genetic deficiency. IUBMB Life. 2003; 55(1):1-11.

Verheijen FW, Verbeek E, Aula N, Beerens CE, Havelaar AC, Joosse M, Peltonen L, Aula P, Galjaard H, van der Spek PJ, Mancini GM. A new gene, encoding an anion transporter, is mutated in sialic acid storage diseases. Nat Genet. 1999; 23(4):462-5.

Viseux N, de Hoffmann E, Domon B. Structural analysis of permethylated oligosaccharides by electrospray tandem mass spectrometry. Anal Chem. 1997; 69(16):3193-8.

Viseux N, de Hoffmann E, Domon B. Structural assignment of permethylated oligosaccharide subunits using sequential tandem mass spectrometry. Anal Chem. 1998; 70(23):4951-9.

Vogt G, Chapgier A, Yang K, Chuzhanova N, Feinberg J, Fieschi C, Boisson-Dupuis S, Alcais A, Filipe-Santos O, Bustamante J, de Beaucoudrey L, Al-Mohsen I, Al-Hajjar S, Al-Ghonaium A, Adimi P, Mirsaeidi M, Khalilzadeh S, Rosenzweig S, de la Calle Martin O, Bauer TR, Puck JM, Ochs HD, Furthner D, Engelhorn C, Belohradsky B, Mansouri D, Holland SM, Schreiber RD, Abel L, Cooper DN, Soudais C, Casanova JL. Gains of glycosylation comprise an unexpectedly large group of pathogenic mutations. Nat Genet. 2005; 37(7):692-700.

Vogt G, Vogt B, Chuzhanova N, Julenius K, Cooper DN, Casanova JL. Gain-of-glycosylation mutations. Curr Opin Genet Dev. 2007; 17(3):245-51.

Völker C, De Praeter CM, Hardt B, Breuer W, Kalz-Füller B, Van Coster RN, Bause E. Processing of N-linked carbohydrate chains in a patient with glucosidase I deficiency (CDG type IIb). Glycobiology. 2002; 12(8):473-83.

von Gunten S, Simon HU. Sialic acid binding immunoglobulin-like lectins may regulate innate immune responses by modulating the life span of granulocytes. FASEB J. 2006; 20(6):601-5.

## W

Wada Y. Mass spectrometry in the detection and diagnosis of congenital disorders of glycosylation. Eur J Mass Spectrom (Chichester, Eng). 2007;13(1):101-3.

Walkley SU, Dobrenis K. Bone marrow transplantation for lysosomal diseases. Lancet. 1995; 345(8962):1382-3.

Wang FF, Hirs CH. Influence of the heterosaccharides in porcine pancreatic ribonuclease on the conformation and stability of the protein. J Biol Chem. 1977; 252(23):8358-64.

Wang Y, Tan J, Sutton-Smith M, Ditto D, Panico M, Campbell RM, Varki NM, Long JM, Jaeken J, Levinson SR, Wynshaw-Boris A, Morris HR, Le D, Dell A, Schachter H, Marth JD. Modeling human congenital disorder of glycosylation type IIa in the mouse: conservation of asparagine-linked glycan-dependent functions in mammalian physiology and insights into disease pathogenesis. Glycobiology. 2001; 11(12):1051-70.

Warner TG, deKremer RD, Sjoberg ER, Mock AK. Characterization and analysis of branched-chain N-acetylglucosaminyl oligosaccharides accumulating in Sandhoff disease tissue. Evidence that biantennary bisected oligosaccharide side chains of glycoproteins are abundant substrates for lysosomes. J Biol Chem. 1985; 260(10):6194-9.

Warren L. The thiobarbituric acid assay of sialic acids. J. Biol. Chem. 1959; 234:1971-5.

Warren G, Malhotra V. The organisation of the Golgi apparatus. Curr Opin Cell Biol. 1998; 10(4):493-8.

Weiss P, Ashwell G. Ligand-induced modulation of the hepatic receptor for asialoglycoproteins. Evidence for the role of cell surface hyposialylation. J Biol Chem. 1989; 264(20):11572-4.

Wilhelm J, Kalyan NK, Lee SG, Hum WT, Rappaport R, Hung PP. Deglycosylation increases the fibrinolytic activity of a deletion mutant of tissue-type plasminogen activator. Thromb Haemost. 1990; 63(3):464-71.

Willems PJ, Gatti R, Darby JK, Romeo G, Durand P, Dumon JE, O'Brien JS. Fucosidosis revisited: a review of 77 patients. Am J Med Genet. 1991; 38(1):111-31.

Winchester B. Lysosomal metabolism of glycoproteins. Glycobiology. 2005; 15(6):1R-15R.

Winder SJ. The complexities of dystroglycan. Trends Biochem Sci. 2001 Feb;26(2):118-24. Erratum in: Trends Biochem Sci 2001; 26(9):575.

Wolf DH, Hilt W. The proteasome: a proteolytic nanomachine of cell regulation and waste disposal.Biochim Biophys Acta. 2004; 1695(1-3):19-31.

Wolfe DE, Schindler D, Desnick RJ. Neuroaxonal dystrophy in infantile alpha-N-acetylgalactosaminidase deficiency. J Neurol Sci. 1995; 132(1):44-56.

Wopereis S, Abd Hamid UM, Critchley A, Royle L, Dwek RA, Morava E, Leroy JG, Wilcken B, Lagerwerf AJ, Huijben KM, Lefeber DJ, Rudd PM, Wevers RA. Abnormal glycosylation with hypersialylated O-glycans in patients with Sialuria. Biochim Biophys Acta. 2006; 1762(6):598-607.

Wopereis S, Grünewald S, Huijben KM, Morava E, Mollicone R, van Engelen BG, Lefeber DJ, Wevers RA. Transferrin and apolipoprotein C-III isofocusing are complementary in the diagnosis of N- and O-glycan biosynthesis defects. Clin Chem. 2007; 53(2):180-7.

Wopereis S, Lefeber DJ, Morava E, Wevers RA. Mechanisms in protein O-glycan biosynthesis and clinical and molecular aspects of protein O-glycan biosynthesis defects: a review. Clin Chem. 2006; 52(4):574-600.

Wuhrer M, Deelder AM, Hokke CH. Protein glycosylation analysis by liquid chromatography-mass spectrometry. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2005; 825(2):124-33.

Wuyts B, Delanghe JR, Kasvosve I, Wauters A, Neels H, Janssens J. Determination of carbohydrate-deficient transferrin using capillary zone electrophoresis. Clin Chem. 2001; 47(2):247-55.

## X

Xin Y, Lasker JM, Lieber CS. Serum carbohydrate-deficient transferrin: mechanism of increase after chronic alcohol intake. Hepatology. 1995; 22(5):1462-8.

## Y

Yamashita K, Hara-Kuge S, Ohkura T. Intracellular lectins associated with N-linked glycoprotein traffic. Biochim Biophys Acta. 1999; 1473(1):147-60.

Yamashita K, Ideo H, Ohkura T, Fukushima K, Yuasa I, Ohno K, Takeshita K. Sugar chains of serum transferrin from patients with carbohydrate deficient glycoprotein syndrome. Evidence of asparagine-N-linked oligosaccharide transfer deficiency. J Biol Chem. 1993; 268(8):5783-9.

Yamashita K, Kochibe N, Ohkura T, Ueda I, Kobata A. Fractionation of L-fucose-containing oligosaccharides on immobilized Aleuria aurantia lectin. J Biol Chem. 1985; 260(8):4688-93.

Yamashita K, Tachibana Y, Takada S, Matsuda I, Arashima S, Kobata A. Urinary glycopeptides of fucosidosis. J Biol Chem. 1979; 254(11):4820-7.

Yamashita K, Tachibana Y, Mihara K, Okada S, Yabuuchi H, Kobata A. Urinary oligosaccharides of mannosidosis. J Biol Chem. 1980; 255(11):5126-33.

Yan Q, Lennarz WJ. Oligosaccharyltransferase: a complex multisubunit enzyme of the endoplasmic reticulum. Biochem Biophys Res Commun. 1999; 266(3):684-9.
Yeowell HN, Walker LC. Mutations in the lysyl hydroxylase 1 gene that result in enzyme deficiency and the clinical phenotype of Ehlers-Danlos syndrome type VI. Mol Genet Metab. 2000; 71(1-2):212-24.

Yet MG, Wold F. The distribution of glycan structures in individual N-glycosylation sites in animal and plant glycoproteins. Arch Biochem Biophys. 1990; 278(2):356-64.

Yoshimura M, Hershman JM. Thyrotropic action of human chorionic gonadotropin. Thyroid. 1995; 5(5):425-34.

Yu H, Chen X. Carbohydrate post-glycosylational modifications. Org Biomol Chem. 2007; 5(6):865-72.

## Z

Zaia J. Mass spectrometry of oligosaccharides. Mass Spectrom Rev. 2004; 23(3):161-227.

Zak BM, Crawford BE, Esko JD. Hereditary multiple exostoses and heparan sulfate polymerization. Biochim Biophys Acta. 2002; 1573(3):346-55.

Zambrano E, Zarinan T, Olivares A, Barrios-de-Tomasi J, Ulloa-Aguirre A. Receptor binding activity and in vitro biological activity of the human FSH charge isoforms as disclosed by heterologous and homologous assay systems: implications for the structure-function relationship of the FSH variants. Endocrine. 1999; 10(2):113-21.

Zanetta JP, Scior T, Wantyghem J, Wermuth C, Aubery M, Strecker G, Michalski JC. Lectin activities of cytokines and growth factors: function and implications for pathology. Histol Histopathol. 1996; 11(4):1101-8.

Zhang H, Li XJ, Martin DB, Aebersold R. Identification and quantification of N-linked glycoproteins using hydrazide chemistry, stable isotope labeling and mass spectrometry. Nat Biotechnol. 2003; 21(6):660-6.

Zhao CM, Chen D, Lintunen M, Panula P, Håkanson R. Secretory organelles in ECL cells of the rat stomach: an immunohistochemical and electron-microscopic study. Cell Tissue Res. 1999; 298(3):457-70.

Zdebska E, Bader-Meunier B, Schischmanoff PO, Dupré T, Seta N, Tchernia G, Kościelak J, Delaunay J. Abnormal glycosylation of red cell membrane band 3 in the congenital disorder of glycosylation Ig. Pediatr Res. 2003; 54(2):224-9.