

Université Science et Technologie de LILLE 1
Ecole Doctorale Biologie-Santé

THESE

Présentée par

JORICK VANBESELAERE

Pour l'obtention du grade de

Docteur de l'Université de Lille 1

Science de la vie et de la santé

Spécialité : Biochimie

Analyses Structurales et Métaboliques de la Sialylation des Vertébrés

Soutenue le 12 Décembre 2013 devant le jury suivant :

Président : Pr Philippe Delannoy

Rapporteurs : Dr Muriel Bardor

Dr Thierry Fontaine

Examineurs : Dr Kazuhiro Aoki

Dr Boris Vauzeilles

Pr Christophe Biot

Dr Yann Guérardel

Gratitudes et Remerciements

Je remercie les Directeurs successifs du l'UGSF Jean-Claude Michalski et Christophe D'Hulst pour m'avoir accueilli dans l'Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle de l'Université Lille 1 - UMR 8576 du CNRS.

J'adresse toute ma gratitude au Pr Philippe Delannoy qui me fait le plaisir de présider la commission d'examen de ma thèse. Je remercie la Dr Muriel Bardor et le Dr Thierry Fontaine d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse en qualité de rapporteurs. Je remercie également chaleureusement le Dr Kazuhiro Aoki, le Dr Boris Vauzeilles, le Dr Yann Guérardel et le Pr Christophe Biot pour avoir accepté d'examiner mon travail de thèse.

Je tiens à remercier tout particulièrement mon directeur scientifique, le Dr Yann Guérardel, pour m'avoir transmis sa passion et sa ferveur pour le domaine fascinant de la glycobiologie et m'avoir accompagné, soutenu et conseillé durant mon doctorat.

Je remercie aussi très chaleureusement l'ensemble du personnel du groupe de la Biodiversité Associée aux Glycoconjugués et les Ingénieurs de la plateforme PAGEs : Nao Yamakawa, Yoann Rombouts, Lan-yi Chang, Estelle Garenaux, Christophe Biot, Diane Jouveneau, Christophe Mariller, Emmanuel Maes, Xavier Trivelli, Bernadette Codeville, Fred Krewinski, Florence Delplace, Elisabeth Ellass, Emeline Fabre, Ossarath Kol, Colette Brassart, Marie-Christine Slomianny, Faustine Dubar, Anne Delmont, Diane Jouveneau, Guenima Sfihi Thomas Hurtaux et l'ensemble des Masters et stagiaires. Toutes ces personnes m'ont apporté de très précieux conseils, une formation scientifique et technique d'excellence dans leurs disciplines respectives au sein d'une parfaite ambiance de travail et de forts moments de camaraderie. Un groupe exceptionnel avec qui j'ai eu la chance de travailler et qui m'a énormément apporté tant sur le plan humain que professionnel.

J'adresse un GRAND merci à l'ensemble du personnel scientifique, administratif et technique de l'UGSF, avec qui j'ai eu la chance d'interagir, grâce aux nombreux projets scientifiques féconds que nous avons développés en collaboration ou lors de discussions scientifiques très intéressantes. Je remercie en particulier l'équipe du Dr François Foulquier et du Pr Philippe Delannoy pour leurs collaborations très enrichissantes. Je remercie infiniment le Dr Nao Yamakawa, le Dr Yoann Rombouts et l'IE Dorothée Vicogne pour leur excellent travail scientifique et leurs précieux conseils au cours de mon doctorat. J'adresse

mes remerciements au Dr Anne Harduin-Lepers pour nos nombreuses discussions scientifiques particulièrement enrichissantes. Je remercie aussi Mme Anne-Marie Mir pour sa formation de qualité aux techniques de culture cellulaire.

Mes remerciements s'adressent aussi au Pr Jose Previatio et Ralph Scharwtz pour leurs aides, leurs soutiens et leurs connaissances précieuses dans le domaine de la parasitologie. Je remercie infiniment Christian Slomianny et Elodie Richard de la plateforme d'Imagerie de l'université de Lille 1 de m'avoir conseillé et transmis leurs connaissances dans le domaine de l'imagerie cellulaire.

Je remercie également l'ensemble des Masters, des Doctorants et des Post-Doctorants avec qui je me suis particulièrement bien amusé durant toutes les pauses déjeuner et les soirées que nous avons faites. Je remercie en particulier Pierre Martinez alias le « Grand Barbu » et Florant Colomb alias « Le Roux » avec qui j'ai eu de très nombreux fou-rires.

Je tiens à remercier de tout mon cœur ma famille, ma compagne et mes amis qui m'ont apporté un soutien affectif extraordinaire et m'ont encouragé tout au long de mon doctorat. Je les remercie aussi pour tous ces moments de pur bonheur passés avec eux durant mes années universitaires.

Liste des Abréviations

Abréviations	Nom complet
AAC	Azide-Alcyne cycloaddition
ADN	Acide Déoxyribo-Nucléique
AG	Acide Gras
ARN	Acide Ribonucléique
BARAC	Biarylazacyclooctyne
BTTAA	2-(4-((bis((1-tert-butyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)amino)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)acetic acid
CCM	Chromatographie sur couche mince
CDG	Maladie Congénitale de la Glycosylation
CFG	Functional Glycomics Gateway
CHCl ₃	Chloroforme
CID	Collision-Induced Dissociation
CMAH	Cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid mono-oxogénase
CMAS	Cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid synthetase
CMP	Cytidine mono-phosphate
COG	Complex Oligomérique Golgien
CuAAC	Copper(I)-catalyzed Azide-Alcyne cycloaddition
DAPI	4',6'-diamidino-2-phénylindole
DCC	Dicyclohexylcarbodiimide
DIBAC	Aza-dibenzocyclooctyne
DIBO	Dibenzocyclooctyne
DIFO	Difluorinated cyclooctyne
DMB	1,2-diamino-4,5-méthylènedioxybenzène
DMF	Diméthylformamide
Dol	Dolichol
DPI	Day Post Infection
FAME	Fatty acid methyl ester
FT	Fucosyl-Transférase
GAG	Glycoaminoglycane
Gal	Galactose
GalNAc	N-Acétylgalactosamine
GC	Chromatographie en phase Gazeuse
GDP	Guanidine Diphosphate
Gg	Ganglio série
Glc	Glucose
GlcNAc	N-Acétylglucosamine
GL	Glycolipides
GNE	N-acétylglucosamine-2-épimérase
GP	Glycoprotéine
GPI	Glycosyl-Phosphatidyl Inositol
GSL	Glycosphingolipides
GT	Glycosyl-Transférase
HFF	Human Foreskin Fibroblast

Abréviations	Nom complet
hpf	Hour Post Fertilization
HPLC	Chromatographie Liquide Haute Performance
IG	Immuno-Globuline
KDN	2-keto-3-deoxynonic acid
KO	Knock-Out
Lc	Lacto série
LCB	Long Chain Base (Céramide)
LDG	Maladie de surcharge lysosomale
Le ^x	Lewis X
LLO	Lipid Link Oligosaccharides
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation
Man	Mannose
ManNAc	N-acétylmannosamine
ManNAI	N-alcyne mannosamine
MCF-7	Michigan Cancer Foundation-7
MeOH	Méthanol
MO	Morpholino Oligonucleotids
MS	Spectrométrie de Masse
MS/MS	Spectrométrie de Masse en Tandem
NANP	<i>N</i> -Acetylneuraminic acid phosphatase
NANS	<i>N</i> -Acetylneuraminic acid synthase
Neu5Ac	Acide 5- <i>N</i> -acétylneuraminique
Neu5Gc	Acide 5- <i>N</i> -glycolylneuraminique
Ng	<i>N</i> -glycannes
Og	<i>O</i> -glycannes
OST	Oligosaccharide Transférase
PAF	Paraformaldéhyde
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PNGase F	Peptide- <i>N</i> -Glycosidase F
RE	Réticulum Endoplasmique
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RT	Room Temperature
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis
SDS-PAGE	Sodium Dodécyl-Sulfate, Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis
SiaNAI	Acide Sialique <i>N</i> -Alcyne
sLe ^x	Sialyl-Lewis X
SPAAC	Strain Promoted Azide-Alcyne cycloaddition
ST	Sialyl-Transférase
TALEN	Transcription activator-like effector nuclease
TGN	Trans Golgi Network
THF	Tetrahydrofurane
TIEF	Transferrin Isoelectric Focusing
TMS	Triméthylsilyle
TOF	Temps de Vol
WB	Western-Blot

Abréviations	Nom complet
WT	Wild Type
ZF	Poisson zèbre
ZFL	Zebra Fish Liver

Index

Index des Figures

Figure 1 : Légende générale de la glycosylation :.....	19
Figure 2 : Présentation des principaux oses simples des eucaryotes supérieurs.	22
Figure 3 : Présentation des principaux oses dérivés chez les eucaryotes supérieurs.....	24
Figure 4 : Organisation cellulaire des principales structures glycaniques de vertébrés. Tiré de (Moremen, Tiemeyer et al. 2012).....	26
Figure 5 : Présentation des structures de N-glycannes de vertébrés.....	29
Figure 6 : Cycle des dolichols phosphate et présentation des principales CDG-I.....	31
Figure 7 : Processus de maturation des N-glycannes dans le Golgi. Tiré de (Moremen, Tiemeyer et al. 2012)....	32
Figure 8 : Présentation des noyaux O-glycaniques de vertébrés.....	37
Figure 9 : Processus de biosynthèse de céramides chez les vertébrés.....	43
Figure 10 : Schéma de biosynthèse des principaux glycosphingolipides de vertébrés.	44
Figure 11 : Expression relative et absolue de la Céramide Synthase dans les organes de souris.	48
Figure 12 : Illustration de l'arbre de vie de métazoaire.....	56
Figure 13 : Procédure d'analyses des glycannes des glycolipides et glycoprotéines du poisson zèbre.	90
Figure 14 : Quantification relative des monosaccharides présents dans les GSL des organes du ZF adulte.	92
Figure 15 : Quantification relative de l'acide sialique dans les GSL des organes du poisson zèbre adulte.	93
Figure 16 : Analyses des bases sphingoïdes dans les testicules du ZF.	94
Figure 17 : Quantification des sphingosines présents dans les GSL du poisson zèbre adulte.....	95
Figure 18 : Quantification des acides gras totaux présents dans les organes du poisson zèbre adulte.	96
Figure 19 : Illustration générale de la fragmentation des glycannes en CID par MS/MS.....	97
Figure 20 : GSL perméthylés du cerveau du poisson zèbre adulte.....	98
Figure 21 : Illustration de la nomenclature et de l'analyse MS/MS du GD1a et GD1b :.....	99
Figure 22 : MS/MS des GSL perméthylés du cerveau du ZF Adulte :.....	101
Figure 23 : MALDI-TOF des GSL perméthylés du cœur du poisson zèbre adulte.	101
Figure 24 : MS/MS des GSL perméthylés du cœur du ZF Adulte :.....	102
Figure 25 : MALDI-TOF des GSL perméthylés des branchies du poisson zèbre adulte.....	103
Figure 26 : MS/MS des GSL perméthylés des branchies du ZF Adulte :.....	104
Figure 27 : MALDI-TOF des GSL perméthylés du foie du poisson zèbre adulte.	105
Figure 28 : MS/MS des GSL perméthylés du foie du ZF Adulte.....	107
Figure 29 : MALDI-TOF des GSL perméthylés de l'intestin du poisson zèbre adulte.....	108
Figure 30 : MS/MS des GSL perméthylés des Intestins du ZF Adulte :.....	109
Figure 31 : MALDI-TOF des GSL perméthylés de la peau du poisson zèbre adulte.....	109
Figure 32 : MS/MS des GSL perméthylés de la peau du ZF Adulte.	110
Figure 33 : MALDI-TOF des GSL perméthylés des testicules du poisson zèbre adulte.	111
Figure 34 : MS/MS des GSL perméthylés du testicules du ZF Adulte.....	112
Figure 35 : MALDI-TOF des GSL perméthylés des ovaires du poisson zèbre adulte.....	113
Figure 36 : MS/MS des GSL perméthylés des ovaires du ZF Adulte :.....	115
Figure 37 : MALDI-TOF des GSL perméthylés du tissu conjonctif et des ovocytes de l'ovaire du ZF adulte.	116
Figure 38 : MALDI-TOF des GSL perméthylés des embryons (6 hpf) du ZF.	117
Figure 39 : Séparation et Purification des GSL d'ovaires sur une colonne de silice.	118
Figure 40 : Analyses des fractions de GSL d'ovaires issues de la purification sur colonne de silice par MS.	119
Figure 41 : MALDI-TOF des oligosaccharides perméthylés et isolés des GSL oligo-fucosylés.....	119
Figure 42 : Quantification relative de l'acide sialique dans les glycoprotéines des organes du ZF adulte.	127
Figure 43 : Profils des N-glycannes perméthylés des organes du poisson zèbre adulte :.....	130

Figure 44 : Profils des O-glycannes perméthylés des organes du poisson zèbre adulte :.....	133
Figure 45 : Western-Blot des glycoprotéines des organes du ZF adulte avec un anticorps anti-KDN.	134
Figure 46 : Immunomarquage des structures KDN liées en α 2-3 dans les intestins du ZF adulte.	135
Figure 47 : Immunomarquage des structures KDN liées en α 2-3 dans le foie du ZF adulte 136	136
Figure 48 : RT-PCR sur les ARNm des organes du ZF ciblant les enzymes des voies métaboliques des Sia.	137
Figure 49 : RT-PCR sur les ARNm des organes du ZF ciblant les Sialyl-Tranfêrases.	138
Figure 50 : RT-PCR sur les ARNm des organes du ZF ciblant les Fucosyl-Tranfêrases (FT).	139
Figure 51 : Page d'accueil de la Base de données des glycannes des glycoconjugués du ZF.	140
Figure 52 : Illustration du fonctionnement de la database sur un exemple de recherche de Ng.	141
Figure 53 : Présentation des principales réactions dites de "Click-Chemistry".....	147
Figure 54 : Mécanisme réactionnel de la CuAAC proposé par (Rostovtsev, Green et al. 2002).....	148
Figure 55 : Présentation des cyclooctines de seconde génération utilisées pour la SPAAC.....	149
Figure 56 : Illustration des applications analytiques de la click-chemistry en glycobiologie.....	150
Figure 57 : Illustration des applications thérapeutiques de la click-chemistry en glycobiologie.....	151
Figure 58 : Synthèse de molécules impliquées dans la réaction de CuAAC.....	153
Figure 59 : Schéma de synthèse des sucres-alcynes.....	155
Figure 60 : Mécanisme réactionnel de la synthèse de la biotine-Azide.....	156
Figure 61 : Mécanisme réactionnel de la synthèse du Ligand (BTAA).....	157
Figure 62 Analyses de MALDI-TOF-MS de nos produits de synthèses pour Click-Chemistry.	158
Figure 63 : Spectre RMN proton et carbone 1D du ManNAI.....	159
Figure 64 : Spectre RMN proton et carbone 1D du SiaNAI.....	159
Figure 65 : Spectre RMN proton et carbone 1D de la Biotine-Azide.....	160
Figure 66 : Spectre RMN proton et carbone 1D du BTAA.....	160
Figure 67 : Test d'incorporation des produits synthétisés dans les cellules MCF-7 en microscopie confocale....	163
Figure 68 : Voie de Biosynthèse de l'acide sialique chez les mammifères, Tiré de (Du, Meledeo et al. 2009)	167
Figure 69 : Mécanismes supposés d'incorporation de l'acide sialique et de ses précurseurs dans les cellules eucaryotes. Tiré de (Bardor, Nguyen et al. 2005).....	168
Figure 70 : Suivi cinétique de l'acide sialique (SiaNAI) dans des fibroblastes primaires d'un individu sain.....	170
Figure 71 : Identification des vésicules produites lors du marquage du SiaNAI dans les fibroblastes contrôles. 171	171
Figure 72 : Utilisation de 2 fixations différentes pour distinguer le SiaNAI libre et conjugué.	172
Figure 73 : Différence d'incorporation du SiaNAI dans les patients CDG-I et CDG-II.....	173
Figure 74 : Intensité de fluorescence golgienne du SiaNAI dans les fibroblastes contrôles et CDG.	174
Figure 75 : Dosage de l'acide sialique dans les fibroblastes contrôles et CDG.	175
Figure 76 : Comparaison des GSL des fibroblastes HFF et de T. Gondii tachyzoïtes.	178
Figure 77 : Suivi cinétique de l'acide sialique (SiaNAI) dans des cellules HFF.....	179
Figure 78 : Suivi cinétique de l'acide sialique (SiaNAI) dans des cellules HFF infecté par T. gondii.....	180
Figure 79 : Spectre MALDI-TOF des N-glycannes sériques de souris durant l'infection par Trypanosoma cruzi. 184	184
Figure 80 : Quantification relative du Neu5Gc et des protéines sériques chez la souris Balb/C.	185
Figure 81 : SDS-Page 1D à 10% et 15% des protéines sériques de souris Balb/c infectées ou non par T. cruzi... 187	187
Figure 82 : Spectres Raman superposés des cellules Hela, du milieu UltraMEM et du ManNAI.	193
Figure 83 : CCM de silice des GSL des cellules Sk-Mel28, MCF-7 WT et clone 44.	210

Index des tableaux

<i>Tableau 1 : Liste des abréviations des glycanes les plus communs :</i>	<i>19</i>
<i>Tableau 2 : Tableau des N-glycannes de tissus et cellules de souris WT (C57Bl/6).....</i>	<i>34</i>
<i>Tableau 3 : Enzymes responsables de la synthèse des principaux noyaux des O-glycannes de mammifères.....</i>	<i>38</i>
<i>Tableau 4 : Tableau des O-glycannes de tissus et cellules de souris WT (C57Bl/6).....</i>	<i>39</i>
<i>Tableau 5 : Les séries des GSL des eucaryotes supérieurs.</i>	<i>42</i>
<i>Tableau 6 : Noms communs, gènes et substrats accepteurs de la biosynthèse des gangliosides.....</i>	<i>45</i>
<i>Tableau 7 : Illustration de l'ensemble des structures identifiées dans le ZF adulte.....</i>	<i>120</i>
<i>Tableau 8 : Classement général des structures hybrides et complexes identifiées des Ng des organes du ZF. ..</i>	<i>131</i>
<i>Tableau 9 : Classement général des structures identifiées des O-glycannes des organes du ZF.....</i>	<i>134</i>
<i>Tableau 10 : Résumé des structures majoritaires des N-glycannes sériques de la souris Balb/C.....</i>	<i>182</i>

Table des Matières

Table des matières

Introduction Générale	17
Chapitre 1 : Les « Oses »	21
1.1 Introduction :	21
1.2 Les oses simples :	21
1.3 Les oses dérivés :	23
1.4 Les liaisons osidiques :	24
1.5 Organisation glycannique des cellules eucaryotes :	26
Chapitre 2 : Les <i>N</i> -glycannes de Vertébrés.....	28
2.1 Introduction :	28
2.2 La biosynthèses des <i>N</i> -glycannes :	29
2.2.1 Maturation réticulaire :	29
2.2.2 Maturation golgienne :	31
2.3 Biodiversité des <i>N</i> -glycannes :	33
2.4 Les fonctions des <i>N</i> -glycannes :	34
Chapitre 3 : Les <i>O</i> -glycannes de Vertébrés	36
3.1 Introduction :	36
3.2 Biosynthèse des <i>O</i> -glycannes de type Mucine :	37
3.3 Biodiversité des <i>O</i> -glycannes :	38
3.4 Fonctions associées aux <i>O</i> -glycannes :	40
Chapitre 4 : Les Glycosphingolipides	41
4.1 Introduction :	41
4.2 Biosynthèse des Glycosphingolipides :	42
4.3 Rôles, fonctions et pathologie des glycosphingolipides :	45
Chapitre 5 : Les maladies congénitales de la glycosylation.....	50
5.1 Introduction :	50
5.2 Les CDG multi-systémiques :	51
5.3 Les CDG spécifiques d'un type de glycosylation :	52
PARTIE A : Analyse structurale des <i>N</i> - et <i>O</i> -glycannes et des Glycosphingolipides du poisson zèbre..	55
Chapitre 1 : Glycobiologie du Poisson Zèbre.....	55
A.1.1 Généralité sur le poisson zèbre :	55
A.1.2 Glycobiologie du poisson zèbre :	58
A.1.3 Nos Objectifs :	61
Chapitre 2 : La lignée cellulaire ZFL	62

A.2.1 Introduction :	62
A.2.2 Publication :	63
A.2.3 Conclusions :	89
Chapitre 3 : Cartographie glycanique des organes du ZF	90
A.3.1 Modes Opératoires :	90
A.3.2 Les Glycosphingolipides du Poisson Zèbre Adulte :	92
A.3.3 Les Glycoprotéines du poisson zèbre :	126
A.3.4 Immuno-marquage du KDN :	134
A.3.5 Expression des Glyco-Gènes :	136
A.3.6 Base de données glycaniques du poisson zèbre :	140
Chapitre 4 : Conclusions	143
PARTIE B : Génération d'une banque de Sucres-Alcynes pour visualiser le métabolisme des glycanes	146
Chapitre 1 : la « Click Chemistry »	146
B.1.1 Introduction :	146
B.1.2 Mécanisme réactionnel de la CuAAC :	147
B.1.3 Illustration de la SPAAC :	148
B.1.4 Applications de la CuAAC en Biologie :	149
B.1.5 Aspects Cliniques de la Click-Chemistry en Glycobiologie :	151
Chapitre 2 : Génération des traceurs glycaniques alcynes	152
B.2.1 Nos objectifs :	152
B.2.2 Introduction :	152
B.2.3 Présentation des synthèses :	153
B.2.4 Caractérisations :	158
B.2.5 Tests de marquage par microscopie des sucres-alcynes :	161
Chapitre 3 : Conclusions	164
PARTIE C : Rôles physiologiques et métaboliques de l'acide sialique associé à diverses pathologies	166
Chapitre 1 : Métabolisme et incorporation de l'acide sialique	166
C.1.1 Introduction :	166
Chapitre 2 : Les applications de la <i>click-chemistry</i>	169
C.2.1 Introduction :	169
C.2.2 Traçage de l'acide sialique dans les Patients CDG :	169
C.2.3 L'acide sialique dans le parasite <i>Toxoplasma gondii</i> :	176
Chapitre 3 : Evolution de la sialylation des N-glycanes sériques au cours de l'infection par <i>Trypanosoma cruzii</i> chez la souris.	181

C.3.1 Introduction :.....	181
C.3.2 Objectifs :	182
C.3.3 Résultats :	182
Chapitre 3 : Conclusions.	188
Conclusion Générale et Discussion	191
Annexes	196
Matériels et Méthodes.....	212
Références.....	226

Introduction

Introduction Générale

La glycobiologie est la discipline scientifique qui s'intéresse aux sucres, glycanes ou saccharides sous toutes leurs formes : monomères, oligomères, simples ou conjugués. Elle a pour objectif de définir précisément les rôles physiologiques des glycanes. Du point de vue chronologique, les biochimistes ont d'abord identifié les monosaccharides et ont ensuite défini leurs organisations en oligosaccharides dans les cellules procaryotes et eucaryotes. Puis, ils se sont intéressés aux mécanismes de biosynthèse et de catabolisme des structures glycaniques qui dépendent de l'activation des monosaccharides, du trafic intracellulaire et de l'expression des glycosyltransférases et des glycosidases au sein de compartiments cellulaires spécifiques. L'ensemble de ces découvertes majeures a nécessité des avancées technologiques importantes, et notamment en biologie structurale qui permet aujourd'hui de définir précisément la nature des oligosaccharides présents sur les glycoconjugués à différentes échelles : moléculaire, cellulaire, tissulaire, organique ou systémique. L'ensemble des études structurales et génétiques permet d'appréhender la biodiversité et la fonction des glycanes au sein des êtres vivants. Les glycanes assurent des fonctions essentielles comme la formation de réserves énergétiques, la reconnaissance et la signalisation cellulaires, la protection vis-à-vis d'agents pathogènes, la formation de la matrice extracellulaire des cellules eucaryotes et le repliement des glycoprotéines. Nous reviendrons en détail, lors des généralités, sur l'organisation des structures glycaniques des cellules eucaryotes en focalisant notre attention sur les vertébrés.

La première partie (A) de mes travaux concerne l'analyse détaillée des glycanes présents sur les glycoconjugués du poisson zèbre, qui est un modèle biologique majeur d'études des vertébrés. Cette étude est réalisée sur plusieurs niveaux d'organisation cellulaire : une lignée cellulaire hépatocytaire de poisson zèbre (ZFL), les embryons et les organes du poisson zèbre adulte. Les résultats de ces travaux ont permis de générer la première cartographie complète des glycanes associés aux glycosphingolipides (GSL) et aux glycoprotéines (GP) du poisson zèbre et mettent en avant la spécificité des structures glycaniques vis-à-vis des organes et des stades de développement. Ces résultats viennent enrichir les données scientifiques collectées sur la glycosylation du poisson zèbre et s'associent parfaitement aux connaissances en génétique et en embryologie pour former un excellent modèle d'étude de la glycobiologie. Ainsi, ces travaux contribuent à promouvoir un modèle biologique en pleine expansion et apportent à la communauté scientifique des détails précis sur l'environnement glycanique des organes et des embryons sur lesquels ils travaillent.

La seconde partie (B) de mes travaux a consisté à synthétiser un panel d'analogues et de monosaccharides-alcynés, ainsi que des molécules impliquées dans leurs révélations. Ces outils ont pour objectif de suivre l'incorporation et la métabolisation des sucres dans une cellule par microscopie à fluorescence *via* une réaction de « click-chemistry » avec un fluorophore-azide. Ainsi, nous avons pu visualiser l'incorporation de ces mimes de sucres-alcynes de manière dynamique dans plusieurs lignées cellulaires et observer leur métabolisation.

La troisième partie (C) se focalise sur la régulation de la sialylation, qui est une modification terminale de la glycosylation, dans des contextes physiopathologiques particuliers. Dans un premier temps, nous avons réalisé des analyses d'imagerie cellulaire sur l'incorporation d'un mime alcyne de l'acide sialique dans des fibroblastes humains atteints ou non par une maladie congénitale de la glycosylation (CDG) et durant l'infection par *Toxoplasma gondii*, l'agent étiologique de la toxoplasmose. Dans un second temps, nous avons réalisé l'analyse structurale du profil des *N*-glycannes des glycoprotéines sériques de souris au cours de l'infection par *Trypanosoma cruzi*. Ces résultats nous ont permis de visualiser et de quantifier les changements de glycosylation sérique. Dans un troisième temps, nous avons analysé les profils de glycosylation des GSL d'une lignée cellulaire de cancer du sein MCF-7 sur-exprimant de manière stable une poly-sialyltransférase. Nous avons ainsi observé un réarrangement total dans l'organisation des gangliosides entre la souche WT et les souches GD3S+. Ces modifications attestent de la capacité de la GD3S à oligomériser l'acide sialique sur les gangliosides de la série 3.

Une partie des résultats sera présentée en anglais au sein d'articles que nous avons publiés, éventuellement complétés de résultats annexes. La majorité des résultats seront développés et commentés en français de manière conventionnelle.

Tableau 1 : Liste des abréviations des glycanes les plus communs :

Abréviations	Monosaccharides
Glc	Glucose
Gal	Galactose
Man	Mannose
GlcNAc	N-acétylglucosamine
GalNAc	N-acétylgalactosamine
ManNAc	N-acétylmannosamine
Neu5Ac	5-Acétyl neuraminique acid
Neu5Gc	5-Glycolyl neuraminique acid
KDN	2-keto-3-deoxynonic acid
Fuc	Fucose

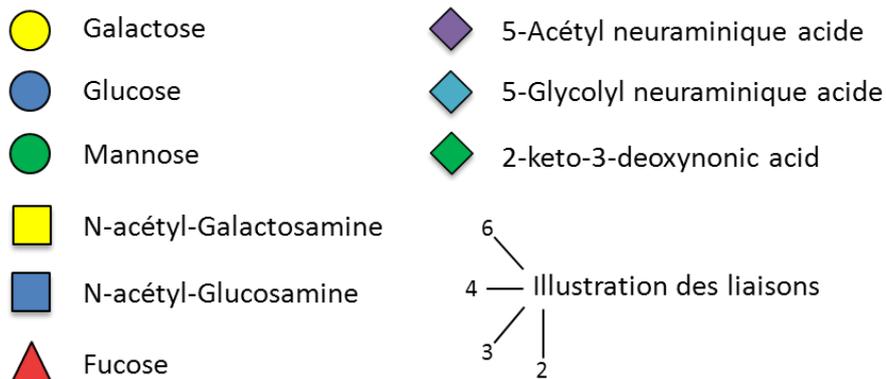


Figure 1 : Légende générale de la glycosylation :

Présentation des structures et liaisons glycaniques utilisées dans ce manuscrit.

Cette représentation est en conformité avec celle adopté par le CFG.

(<http://www.functionalglycomics.org/static/consortium/CFGnomenclature.pdf>)

Généralités

Généralités sur la glycobiologie.

Chapitre 1 : Les « Oses »

1.1 Introduction :

Le terme « glycanne » renvoie à oligosaccharide ou polysaccharide et correspond à une chaîne de monosaccharides liés entre eux par des liaisons osidiques ; le mot monosaccharide est d'origine grec puisque mono- signifie unique et que -saccharide signifie sucre. Notre connaissance de la glycobiologie métabolique, structurale et fonctionnelle des êtres vivants s'est fortement développée ces dernières années grâce aux techniques modernes de biochimie, biologie moléculaire et de biologie structurale. Ces techniques ont permis d'entrevoir l'extrême complexité structurale de ces modifications co- et post-traductionnelles, qui s'exprime grâce à un nombre important de monosaccharides, de possibilités de branchement associées aux anoméries α ou β , de conformations ou de modifications réversibles par acétylation ou sulfatation ([Pilobello and Mahal 2007](#)). Afin de contrôler finement la biosynthèse et la dégradation de ces architectures glycaniques, la cellule possède un système enzymatique complexe, spécifique et organisé au sein des compartiments cellulaires. Les glycannes assurent des rôles de réserves énergétiques, de repliement et de stabilité protéique, de reconnaissance cellulaire et d'adhésion à la matrice extracellulaire. La diversité structurale de la glycosylation s'illustre particulièrement au sein de la classification des êtres vivants, puisqu'elle s'exprime très différemment chez les eucaryotes et les procaryotes ([Bishop and Gagneux 2007](#)). Cette diversité structurale est également importante au sein des eucaryotes dans le domaine des protistes, des chromistes, des plantes, des champignons et des animaux vertébrés et invertébrés ([Katoh and Tiemeyer 2013](#)). Cette introduction aura pour objectif de préciser les différents aspects biochimiques, structuraux et fonctionnels des glycannes dans les cellules eucaryotes animales de vertébrés.

1.2 Les oses simples :

Les monosaccharides sont les unités élémentaires non-hydrolysables des structures glycaniques dont la formule chimique est $C_n(H_2O)_n$. Ce sont des polyalcools représentés par les groupes des poly-hydroxy-aldéhydes et poly-hydroxy-cétones. La nomination de ces molécules neutres et réductrices est réalisée en fonction du nombre de carbone, de la terminaison « -ose » et de leur groupe chimique aldéhyde ou cétone. Chez les eucaryotes, les oses naturels sont limités de 3 à 6 atomes de carbone et portent les appellations suivantes : aldotriose, aldotétraose, aldopentose, aldohexose ou cétotriose, cétotétraose, cétopentose et cétohexose. Par convention, tous les carbones des monosaccharides sont numérotés en forme linéaire, suivant la représentation de Fisher, de manière à ce que le

carbone réducteur ait le plus petit numéro possible ; ainsi les aldoses ont leur fonction aldéhyde sur le carbone 1 et les cétooses sur le carbone 2. Les oses sont classés en série D ou L par rapport à la position de l'hydroxyle du dernier carbone asymétrique de la molécule ; la série D étant naturellement beaucoup plus abondante. Les pentoses et hexoses, par une réaction intramoléculaire, peuvent former un cycle furanosique ou pyranosique possédant respectivement 5 ou 6 atomes de carbone. Cette réaction intramoléculaire s'effectue entre la fonction aldéhyde ou cétone et une fonction hydroxyle du carbone 4 ou 5 en fonction de la taille du cycle formé. La cyclisation des oses fait apparaître un carbone asymétrique supplémentaire en position 1, qui détermine l'anomérie α ou β par rapport à la position de son hydroxyle lors de la fermeture du cycle. La cyclisation est un phénomène réversible en solution qui permet à un ose de passer librement d'une forme linéaire à une forme cyclique d'anomérie α ou β et inversement, cependant la forme linéaire n'est pas la plus favorable et ne représente que 1 % des trois formes possibles. Le phénomène de cyclisation des oses les oblige à adopter une conformation spatiale répartie entre 3 configurations principales ; les formes : chaise, chaise inversée et bateau. Pour comprendre la biodiversité des oses simples, il faut considérer qu'un aldohexose cyclique possède 5 carbones asymétriques qui représentent 2^5 stéréo-isomères, soit 32 aldohexoses différents. Quant aux cétohexoses cycliques, ils possèdent un carbone asymétrique de moins et ne représentent que 16 cétohexoses différents. Malgré un nombre théorique important d'oses simples, seuls quelques stéréo-isomères particuliers sont retrouvés en abondance chez les vertébrés, à savoir : le α -D-glucopyranose, le D-galactopyranose, le D-mannopyranose, le D-ribose, le D-xylofuranose, le L-fructopyranose (cf. Figure 2).

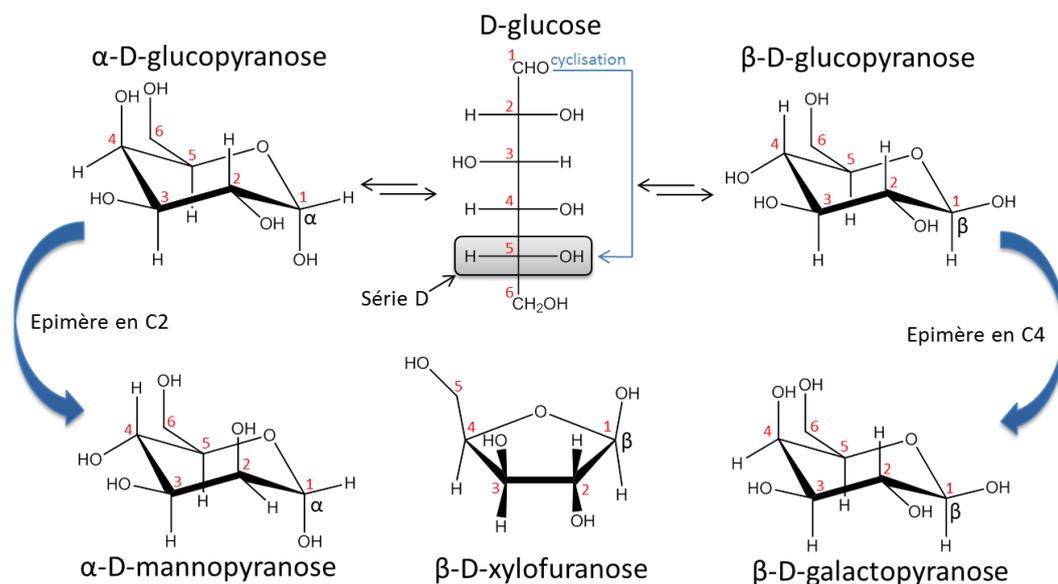


Figure 2 : Présentation des principaux oses simples des eucaryotes supérieurs.

Illustration des monosaccharides communs et simples des eucaryotes sous leurs formes cycliques ou linéaire : α -D-Glc, D-Glc, β -D-Glc, α -D-Man, β -D-Xyl et β -D-Glc. Les carbones des monosaccharides sont numérotés en rouge à partir de leur fonction réductrice. Ces monosaccharides peuvent se cycliser et des inter-conversions spécifiques sont possibles entre le glucose et le mannose ou le galactose grâce aux épimérases de position C2 ou C4 respectivement.

1.3 Les oses dérivés :

Il existe plusieurs types de dérivés des oses comme les oses aminés, les déoxyoses, les oses phosphatés et les acides sialiques (*cf.* Figure 3). Les oses aminés ou osamines possèdent une fonction amine sur leur carbone 2 et sont transformés en *N*-acétylhexosamines par acétylation dans la cellule. Les osamines sont retrouvées principalement sous forme pyranosique *D-N*-acétylglucosamine, *D-N*-acétylgalactosamine, *D-N*-acétylmanosamine chez les eucaryotes. Les oses phosphatés sont impliqués dans les voies énergétiques du cycle de Krebs ou des pentoses phosphates, mais également dans les voies métaboliques de recyclages et de biosynthèses des oligosaccharides. Les déoxyoses sont des oses dérivés qui ont perdu une fonction hydroxyle et se trouvent principalement dans les glycanes de vertébrés sous forme d' α -L-fucopyranose qui correspond à l' α -6-deoxy-L-galactopyranose. Les acides sialiques sont des oses dérivés synthétisés directement dans le cytosol et possédant une charge négative associée à un groupement carboxyle en position 1. Ils sont constitués d'un squelette carboné à 9 atomes et peuvent être transformés par des modifications sur leur fonction amine et par acétylation et/ou sulfatation de leurs hydroxyles. L'acide sialique néo-synthétisé dans le cytosol doit ensuite être activé dans le noyau en nucléotide-sucre (CMP-Sia) pour être utilisé par les sialyltransférases (ST) et incorporé sur les oligosaccharides des glycoconjugués. L'enzyme de la cytidine monophosphate-*N*-acetylneuraminic acid hydroxylase (CMAH), qui n'est pas fonctionnelle chez l'Homme ([Irie, Koyama et al. 1998](#)), permet de transformer le CMP-Neu5Ac en CMP-Neu5Gc par la transformation en position 5 du groupe *N*-acétamide en groupe *N*-glycolyl ([Shaw and Schauer 1988](#)). Le *2-keto-3-deoxynonic acid* (KDN) a été découvert plus récemment en 1986, il est présent sur les glycoconjugués eucaryotes et procaryotes et a les mêmes caractéristiques de liaison et d'activation en CMP-Sia que les autres acides sialiques ([Inoue and Kitajima 2006](#)).

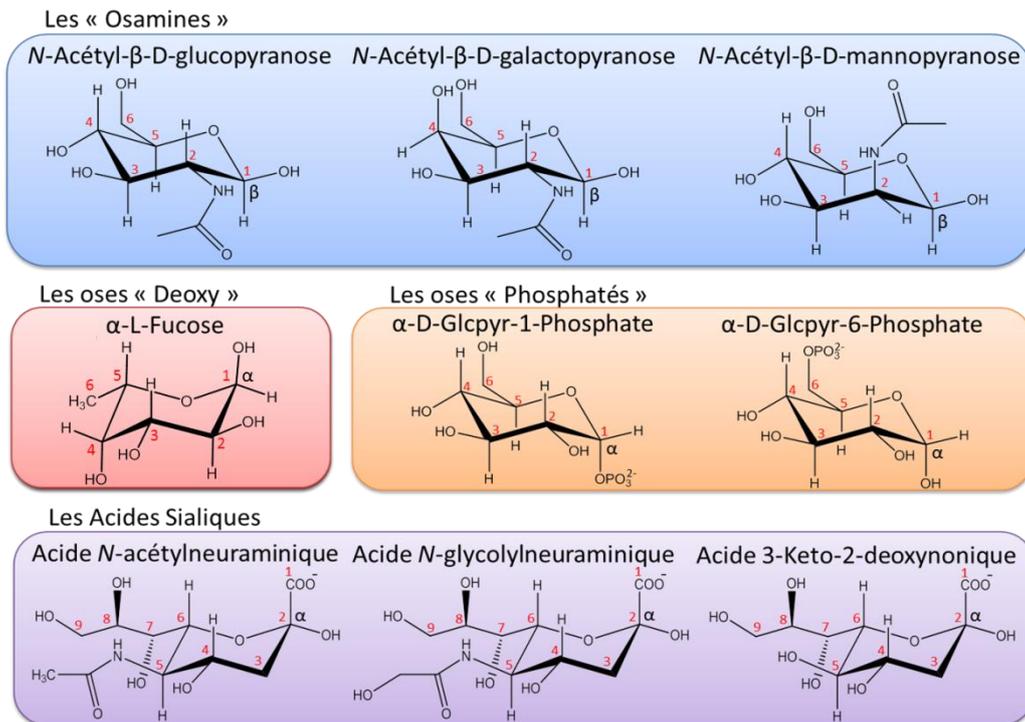


Figure 3 : Présentation des principaux oses dérivés chez les eucaryotes supérieurs

Illustration des monosaccharides communs et dérivés des eucaryotes sous leurs formes cycliques, définissant les structures des osamines, déoxyoses, oses phosphatés et des acides sialiques. Les carbones des monosaccharides sont numérotés en rouge.

1.4 Les liaisons osidiques :

Les liaisons osidiques sont des liaisons covalentes entre des oses naturels et/ou dérivés par la réaction de l'hydroxyl hémiacétalique réducteur en position anomère α ou β avec l'un des hydroxyles libres présents sur un autre ose (liaison holoside) ou sur un aglycone (liaison hétéroside). Cette réaction libère une molécule d'eau et bloque l'anomérie du sucre donneur en position α ou β . La formation des liaisons osidiques est bio-catalysée par des enzymes appelées glycosyltransférases (GT) qui ont leurs propres spécificités vis-à-vis de l'anomérie α ou β , de la position du transfert, des substrats donneurs et accepteurs. Dans la majorité des cas le substrat donneur des GT est un nucléotide-sucre. Les GT sont des enzymes extrêmement bien conservées au cours de l'évolution. Elles possèdent une signature caractéristique en acides aminés au niveau de leurs sites catalytiques qui dépend de leurs activités catalytiques et une structure tridimensionnelle précise puisqu'il n'existe que deux systèmes de repliement des GT ([Chang, Singh et al. 2011](#)). La classification des GT évoluent constamment pour intégrer les 115101 enzymes identifiées à ce jour dans les 94 familles de GT (CAZy Database) en fonction de leur mécanisme d'action (rétention ou inversion de l'anomérie), leur substrat donneur et accepteur et de l'organisme desquels elles sont issues. Prenons les exemples des sialyltransférases (ST) nommées ST8Sia-I et ST6Gal-II,

la première enzyme catalyse le transfert d'un acide sialique sur autre acide sialique par la formation d'une liaison en α 2-8, alors que la seconde catalyse le transfert d'un acide sialique sur un galactose par la formation d'une liaison en α 2-6 ; l'incrément en chiffres romains des GT indique l'ordre de découverte de celles-ci dans un organisme.

La présence de structures glycaniques au sein d'un organisme vivant ne peut pas être déduite directement de l'analyse de son génome, puisque ces structures dépendent de la présence des substrats glycaniques et de l'expression de nombreuses GT et glycosidases localisées dans différents compartiments cellulaires et que ces conditions varient énormément en fonction des individus, des cellules, des tissus, des organes et du contexte physiopathologique. Il est admis que les liaisons glycaniques apportent un niveau de complexité supérieur par rapport aux liaisons protéiques ou nucléiques, puisque trois oses naturels peuvent former en théorie plus de 1000 séquences oligosaccharidiques différentes alors que 3 acides aminés ou acides nucléiques différents ne peuvent former que six séquences différentes ([Werz, Ranzinger et al. 2007](#)). Cependant, le nombre et la spécificité des GT pour la formation *in vivo* des oligosaccharides limitent fortement le nombre de structures possibles à partir de 3 oses. Le caractère génétique indirect de la formation de structures glycaniques et la complexité engendrée par leurs possibilités de liaisons ont contraint les scientifiques à utiliser des techniques biochimiques, chromatographiques et spectroscopiques avancées pour élucider finement les liaisons des structures au cas par cas.

1.5 Organisation glycannique des cellules eucaryotes :

Box 1 | Major classes of vertebrate glycan structures

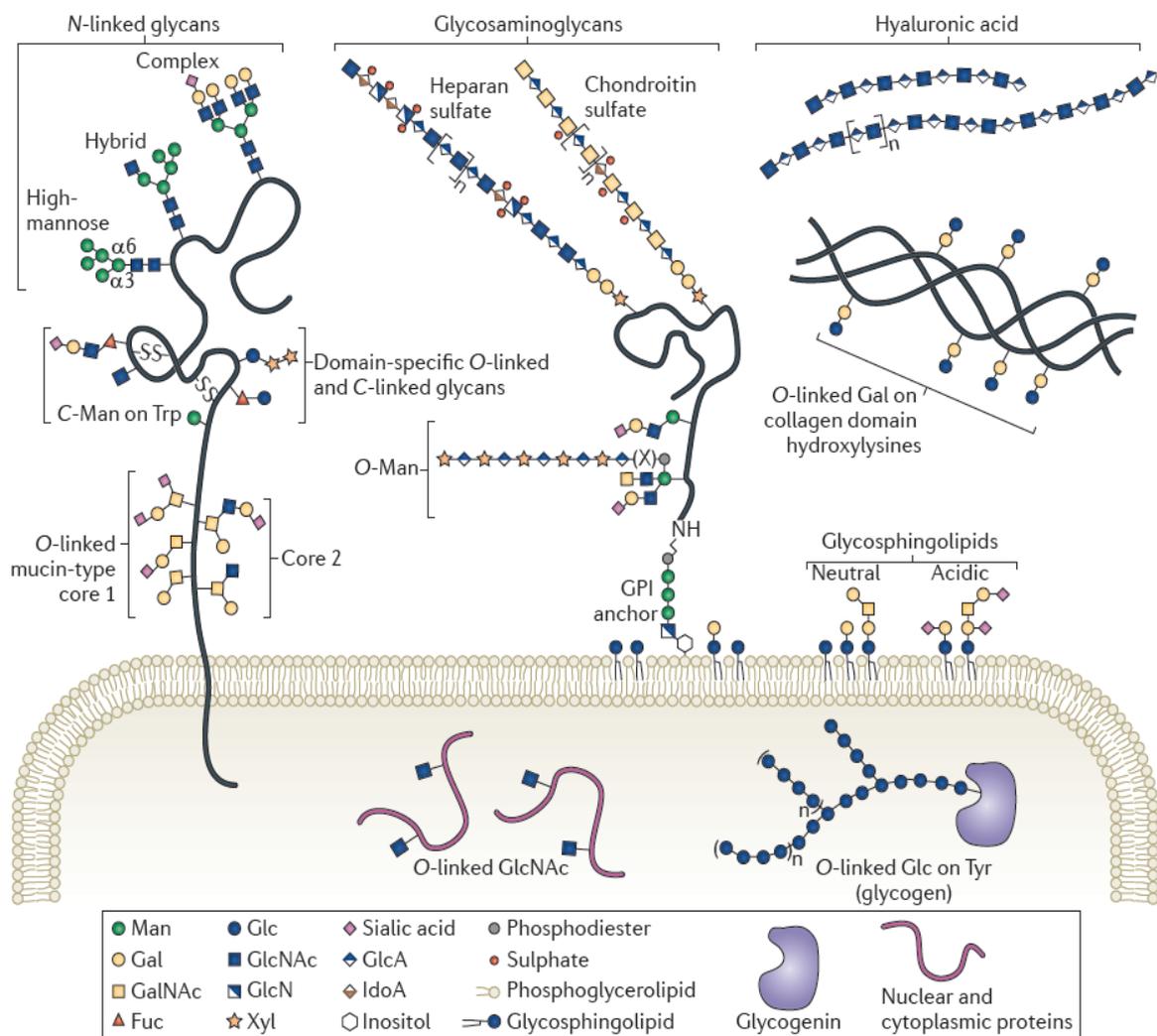


Figure 4 : Organisation cellulaire des principales structures glycanniques de vertébrés. Tiré de ([Moremen, Tiemeyer et al. 2012](#))

Les glycoprotéines portent les *N*-glycannes et les *O*-glycannes. Les ancrés GPIs sont les ancrages membranaires des protéoglycannes qui accueillent la *O*-manosylation et les glycoaminoglycannes de types héparanes et chondroitanes sulfates. Les glycosphingolipides sont des structures glycanniques membranaires qui peuvent être neutres ou acides, en fonction des glycannes qui les composent. Les structures glycanniques de la matrice extracellulaire sont principalement l'acide hyaluronique et la *O*-galactosylation du collagène. Enfin, la glycosylation intracellulaire est représentée majoritairement par le glycogène qui est une forme de réserve énergétique et la *O*-GlcNAcylation qui régule la signalisation cellulaire. Il existe également des formes libres ou activées des saccharides dans le cytosol.

Les cellules eucaryotes sont composées d'environ 50 % de leurs poids secs en glycannes de formes libres, oligomérisées, polymérisées et/ou conjuguées qui se retrouvent dans les polyholosides de réserves, les glycoprotéines (GP), les glycolipides (GL), les ancrés glycophosphoinositol (GPI) et les glycoaminoglycannes (GAG) ([Moremen, Tiemeyer et al.](#)

[2012](#)). Les polyholsides eucaryotes de glucoses sont retrouvés sous forme de glycogène, d'amidon et de cellulose qui assurent les fonctions de réserves énergétiques et de soutien. Ces polyholsides ne diffèrent que par leurs anoméries de liaison et la fréquence de leurs ramifications, ces seuls paramètres suffisent à conférer une solubilité et des fonctions complètement différentes à ces polymères de glucoses ([Gilbert, Wu et al. 2013](#)). Les protéines eucaryotes subissent d'importantes étapes de maturation de glycosylation réticulaire et golgienne, de manière co-translationnelle et post-translationnelle, qui les transforment en glycoprotéines. Les deux classes majeures de la glycosylation des protéines eucaryotes animales sont la *N*-glycosylation (Ng) et la *O*-glycosylation (Og) ; on estime que plus de 50 % des protéines cellulaires et sécrétées sont glycosylées ([Apweiler, Hermjakob et al. 1999](#)). La glycosylation des protéines influence directement leurs fonctions puisque les structures glycaniques assurent le repliement correct de la protéine et allongent sa durée de demi-vie. Les glycolipides sont des composants abondants des membranes des cellules eucaryotes qui contiennent une partie glycanique variable associée à une partie lipidique qui peut être un glycéro-lipide, un céramide ou une base GPI. Les glycolipides et les glycoprotéines assurent les fonctions de reconnaissances cellulaires, d'interactions cellules-cellules, de récepteur de surface et d'adressage membranaire. Les GAG sont des polymères constitués d'un enchaînement d'unités di-saccharidiques linéaires comportant un résidu de GlcNAc ou GalNAc associé à un résidu d'acide glucuronique (GlcUA) ou iduronique (IdoUA). Les GAGs se définissent en fonction de la nature des oses et des liaisons utilisées pour former les motifs di-saccharidiques : les hyaluronanes (GlcUA β 1-3GlcNAc β 1-4), les dermatanes (IdoUA β 1-3GalNAc β 1-4), les chondroïtanes (GlcUA β 1-3GalNAc β 1-4), les kératanes (Gal β 1-4GlcNAc β 1-3) et les héparanes (IdoUA α 1-4GlcNAc α 1-4) ([Gama and Hsieh-Wilson 2005](#)). Ces GAGs, à l'exception de l'acide hyaluronique, sont sulfatés sur différentes positions de leur *N*-acétylhexosamine, et possèdent donc une importante charge négative. Les GAGs peuvent être libres dans l'espace intercellulaire ou reliés à une membrane plasmique par une association avec une protéine et une ancre GPI et assurent les fonctions d'adhésion cellulaire, de rétention d'eau, d'immunité, de maintien avec le collagène et de reconnaissance cellulaire grâce à de fortes interactions lectiniques ([Wang and Luo 2013](#)). Le processus de glycosylation des cellules de vertébrés se déroule en 3 étapes : l'initiation, l'élongation et la glycosylation terminale ou périphérique. La première étape d'initiation consiste à transférer ou synthétiser un noyau saccharidique commun sur un glycoconjugué. La seconde étape d'élongation permet de développer et de ramifier le noyau saccharidique de départ avec des structures glycaniques spécifiques appelées « antennes ». Enfin, l'étape finale de la glycosylation permet d'ajouter des motifs périphériques tels que le fucose et l'acide sialique et permet de générer des antigènes spécifiques. Nous allons définir dans les chapitres 2-4 les différentes structures glycaniques des glycoconjugués de vertébrés que nous avons étudiées : *N*-glycannes, *O*-glycannes et glycosphingolipides. Nous évoquerons pour chacune de ces molécules leurs caractéristiques structurales, leurs voies de biosynthèse, leurs fonctions, leurs diversités et les pathologies auxquelles elles peuvent être associées.

Chapitre 2 : Les N-glycannes de Vertébrés

2.1 Introduction :

La principale liaison des N-glycannes (Ng) eucaryotes est produite par la réaction de l'hémiacétal d'une β -N-acétylglucosamine avec la fonction amine d'une asparagine (Asn) au sein d'une séquence consensus Asn-X-Ser/Thr ([Marshall 1972](#)) avec pour seule condition que l'acide aminé X soit différent de la proline. Les séquences Asn-X-Ser et Asn-X-Thr représentent 96,5 % des sites totaux de N-glycosylation chez la souris. Plusieurs séquences minoritaires de N-glycosylation chez la souris ont été identifiées : Asn-X-Cys, Asn-X-Val et Asn-Gly, mais elles ne représentent que 3,5 % des sites totaux de N-glycosylation ([Zielinska, Gnad et al. 2010](#)). Les Ng des vertébrés sont tous constitués d'un noyau penta-saccharidique commun de $\text{Man}\alpha 1-6(\text{Man}\alpha 1-3)\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-\text{Asn}$ qui peut accueillir jusqu'à 6 antennes glycaniques. La nature des oligosaccharides des antennes sert à définir le type de Ng parmi ces 3 possibilités : les « oligomannoses » dont les antennes sont exclusivement constituées de mannoses, les « complexes » dont les antennes sont principalement constituées de N-acétyllactosamine de type 1 ($\text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc}\beta 1\text{R}$) ou de type 2 ($\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1\text{R}$) et les « hybrides » dont des antennes appartiennent aux deux types précédents (*cf.* Figure 5). Le noyau penta-saccharidique commun des Ng débute sa synthèse au niveau du Réticulum Endoplasmique (RE) et la termine à l'intérieur de l'appareil de Golgi. Les enzymes golgiennes assurent l'étape d'élongation des Ng par la formation des antennes et l'étape terminale de maturation des Ng complexes et hybrides par l'addition d'unités de fucoses et/ou d'acides sialiques. La biosynthèse réticulaire des Ng produit peu de variabilité structurale puisqu'elle ne forme que des structures oligomannosylées glucosylées impliquées dans le processus de repliement des protéines. *A contrario*, la maturation golgienne des Ng est responsable de la glycosylation terminale qui apporte une véritable diversité structurale et fonctionnelle par la formation de motifs antigéniques spécifiques sur les glycoprotéines tels que les antigènes Lewis ($\text{Le}^A \text{Le}^B \text{Le}^Y \text{Le}^X$) associés de leurs versions sialylées ($\text{SLe}^A \text{SLe}^B \text{SLe}^Y \text{SLe}^X$) ou sulfatées et les antigènes du groupe sanguin (A, B et H) ([Cummins 2009](#)).

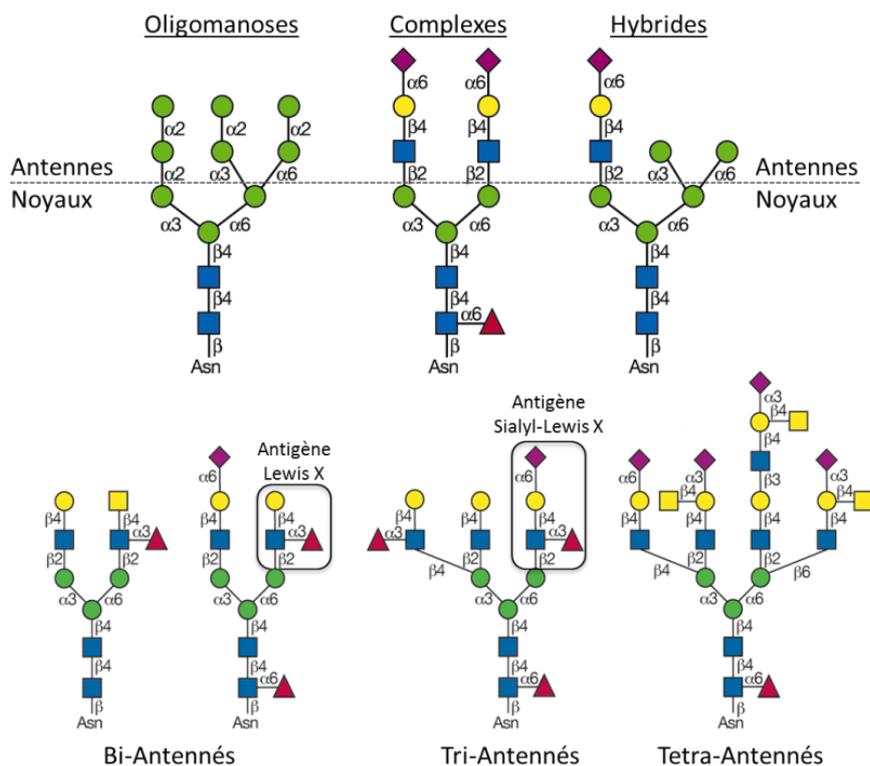


Figure 5 : Présentation des structures de N-glycannes de vertébrés.

Présentation des différents N-glycannes de type oligomannose, complexe et hybride qui se distinguent par la glycosylation de leurs antennes. Des exemples de N-glycannes bi-, tri- et tetra-antennés sont donnés dans la partie inférieure et illustrent la glycosylation périphérique des antennes par sialylation et fucosylation qui forment différents antigènes comme le Lewis X et le Sialyl-Lewis X.

2.2 La biosynthèse des N-glycannes :

2.2.1 Maturation réticulaire :

La biosynthèse des Ng chez les vertébrés (*cf.* Figure 6) commence par la formation d'un oligosaccharidique précurseur couplé à un support lipidique de dolichol-diphosphate (Dol-PP) aboutissant au $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNac}_2\text{-PP-Dol}$ appelé LLO (*Lipid Link Oligosaccharide*). La biosynthèse du LLO fait appel au cycle des dolichols-phosphates qui a été parfaitement décrit chez la levure ([Burda and Aebi 1999](#)) et transposée aux vertébrés. Les premiers glycannes du LLO sont assemblés sur la face cytoplasmique du RE sur un dolichol-monophosphate (Dol-P) grâce à des GT spécifiques utilisant des nucléotides sucres d'UDP-GlcNAc et de GDP-Man. Un complexe de GT formé de Alg-7, Alg-14 et Alg-13 permet de transférer 1 phosphate et 2 GlcNAc sur le Dolichol-P ([Lu, Takahashi et al. 2012](#)). Les Alg-1, Alg-2 et Alg-11 agissent ensuite séquentiellement pour transférer 5 Man et former le $\text{Man}_5\text{GlcNac}_2\text{-Dol-PP}$. Cette structure bascule ensuite à l'intérieur du RE grâce à la flippase RFT1 ([Helenius, Ng et al. 2002](#)) afin d'achever la synthèse du $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNac}_2\text{-Dol-PP}$ par des GT spécifiques du RE utilisant du Dol-P-Glc et du Dol-P-Man comme substrat donneur.

Cet oligosaccharide précurseur va être transféré en bloc sur les séquences Asn-X-Ser/Thr d'une protéine naissante de manière co-translationnelle dans le RE par l'action d'une enzyme appelée oligosaccharidyl transférase (OST). Le $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNac}_2\text{-PP-Dol}$ est le substrat préférentiel de l'OST grâce à son glucose terminal, mais il arrive que l'OST utilise des substrats intermédiaires plus courts ([Karaoglu, Kelleher et al. 2001](#)) induisant une sous-glycosylation des protéines. Suite aux transferts glycaniques sur la protéine de l'OST, un processus extrêmement bien conservé chez les eucaryotes de contrôle qualité du repliement des protéines se met en place, par l'action séquentielle de protéines réticulaires: les chaperonnes BIP (*Binding Immunoglobulin Protein*) et DPI (*Di-Sulphide Isomérase*), les lectines calnexine (CNX), calréticuline (CRT) et ERp57, les glucosidases I et II (GI et GII), la mannosidase (ERMan1) et une glucosyltransférases (UGGT) ([D'Alessio, Caramelo et al. 2010](#)). Ce processus commence par la digestion de l'oligosaccharide précurseur par les glucosidases GI et GII pour former le $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNac}_2\text{-Asn}$ qui est reconnu par les lectines CNX et ERp57 ou CRT et ERp57 qui mettent en forme la protéine grâce notamment aux chaperonnes DPI qui forment les ponts di-sulfures et la chaperonne BIP. Après une première tentative de repliement de la protéine, la GII digère le dernier glucose de la molécule et forme l'oligosaccharide $\text{Man}_9\text{GlcNac}_2\text{-Asn}$. A ce stade, la protéine peut être correctement repliée ou non et sera dirigée en conséquence vers la voie de sécrétion golgienne ou vers un nouveau cycle CNX/CRT de repliement ([Lederkremer 2009](#)). La protéine bien repliée emprunte la voie de sécrétion golgienne après digestion d'un mannose par l'ErMan1 formant le $\text{Man}_8\text{GlcNac}_2\text{-Asp}$. La protéine mal repliée est re-glycosylée par l'UGGT formant à nouveau le $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNac}_2\text{-Asn}$ qui va subir à nouveau un cycle CNX/CRT et une digestion de son glucose par la GII. Si la protéine ne se replie pas correctement après plusieurs cycles CNX/CRT, l'oligosaccharide sera digéré séquentiellement par les mannosidases ErMan1 et EDEM (ER Degradation Enhancing α -mannosidase like protein) formant le $\text{Man}_7\text{GlcNac}_2\text{-Asp}$ reconnu par la chaperonne ERp57 seule qui conduit la glycoprotéine mal conformée dans le cytoplasme par retro-translocation et co-polyubiquitinylation ([Li and Ye 2008](#)). Finalement, la glycoprotéine est dé-glycosylée dans le cytoplasme par la Peptide-N-glycosidase F (PNGase F). La protéine sera dégradée par la voie du protéasome et l'oligosaccharide libre sera digérée par l'ENGase F et les mannosidases cytosoliques avant d'être complètement dégradée et recyclée dans le lysosome. Ce processus de dégradation spécifique des protéines mal conformées est appelé ERAD pour *Endoplasmic Reticulum Association Degradation of Proteins* ([Smith, Ploegh et al. 2011](#)).

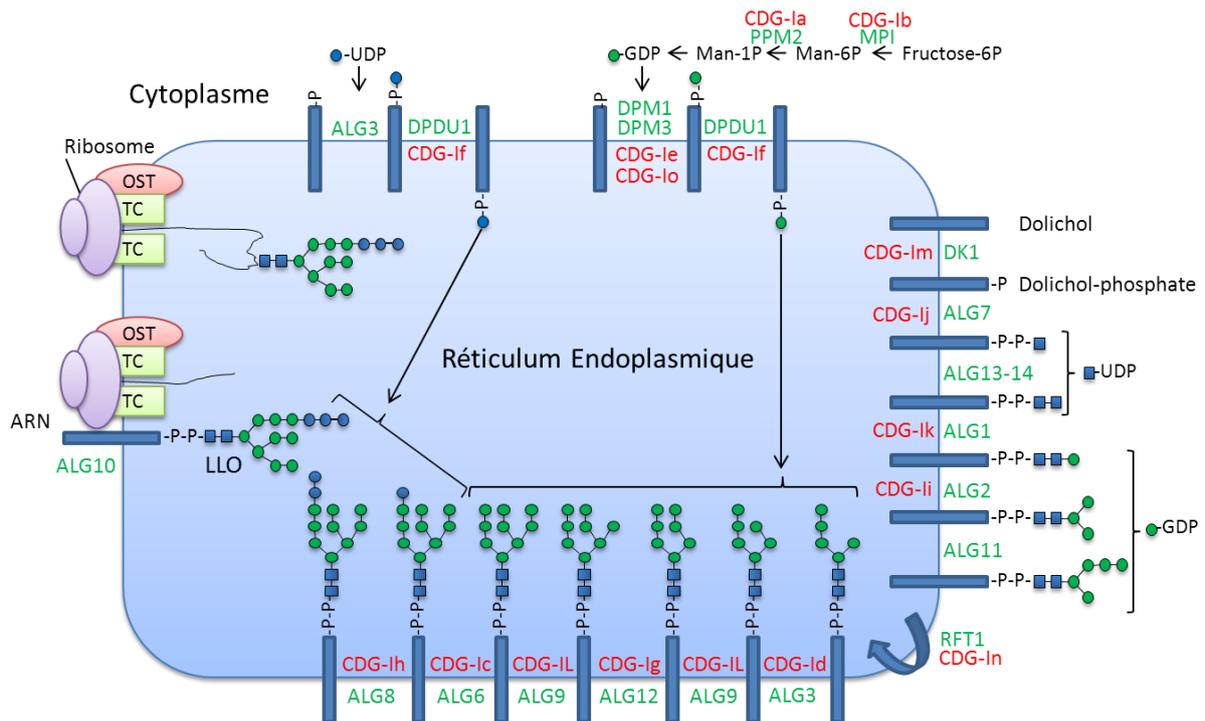


Figure 6 : Cycle des dolichols phosphate et présentation des principales CDG-I

La biosynthèse réticulaire du LLO (*Lipid Link Oligosaccharide*) au sein du cycle des dolichols-phosphates est présentée de manière séquentielle. Les enzymes impliquées entre chaque étape sont indiquées en couleur verte. Les CDG-I issues de la défaillance d'une de ces enzymes sont indiquées en vis-à-vis en couleur rouge, se référant à l'ancienne nomenclature. La nouvelle nomenclature peut facilement être déduite puisqu'elle utilise le nom du gène impliqué suivi de -CDG. La CDG-Ia, impliquant la phospho-mannomutase 2, se définit donc maintenant comme la PMM2-CDG.

2.2.2 Maturation golgienne :

Le Golgi est délimité en quatre saccules distinctes appelées, du noyau vers la membrane, cis-Golgi, Golgi-médian, trans-Golgi et trans-Golgi network (TGN) contenant chacune des glycosyl-transférases membranaires spécifiques (cf. Figure 7) ([Rabouille, Hui et al. 1995](#); [Rizzo, Parashuraman et al. 2013](#)). Le Man8GlcNAc2-Asn est digéré dans le cis-Golgi en Man5GlcNAc2-Asn par la mannosidase I. La digestion par la mannosidase I peut être incomplète, ce qui induit la synthèse de Ng oligomannosidiques de type Man6-8GlcNAc2-Asn sur des protéines matures. Le Man5GlcNAc2-Asn reçoit ensuite une unité de GlcNAc liée en β 1-2 sur le mannose lié en α 1-3 par la GlcNAc-TI qui utilise de l'UDP-GlcNAc comme substrat donneur ([Chen, Unligil et al. 2001](#)). Le Man5GlcNAc3-Asn est alors transféré dans le Golgi-médian où il est digéré par la mannosidase II en Man3GlcNAc3-Asn qui est reconnu par la GlcNAc-TII pour former du Man3GlcNAc4-Asn ([Rose 2012](#)). Plusieurs GlcNAc-T (IV, V, VI, VII et VIII) peuvent intervenir sur cette structure pour augmenter le nombre d'antennes, mais seule la GlcNAc-TIII est capable de transférer une GlcNAc intercalaire sur le noyau pentasaccharidique. La présence d'une GlcNAc sur le mannose en position distale n'est pas considérée comme une antenne supplémentaire. Il est également possible que, dans le

Golgi-médian, le noyau commun des Ng soit fucosylé en α 1-6 par la Fuc-T VIII qui utilise le GDP-Fuc comme substrat donneur. Enfin, ces structures sont transférées dans le trans-Golgi pour achever leur élongation et réaliser la glycosylation terminale des Ng en ajoutant des unités de Gal, de GlcNAc, de Fuc et d'acides sialiques grâce à différentes GT.

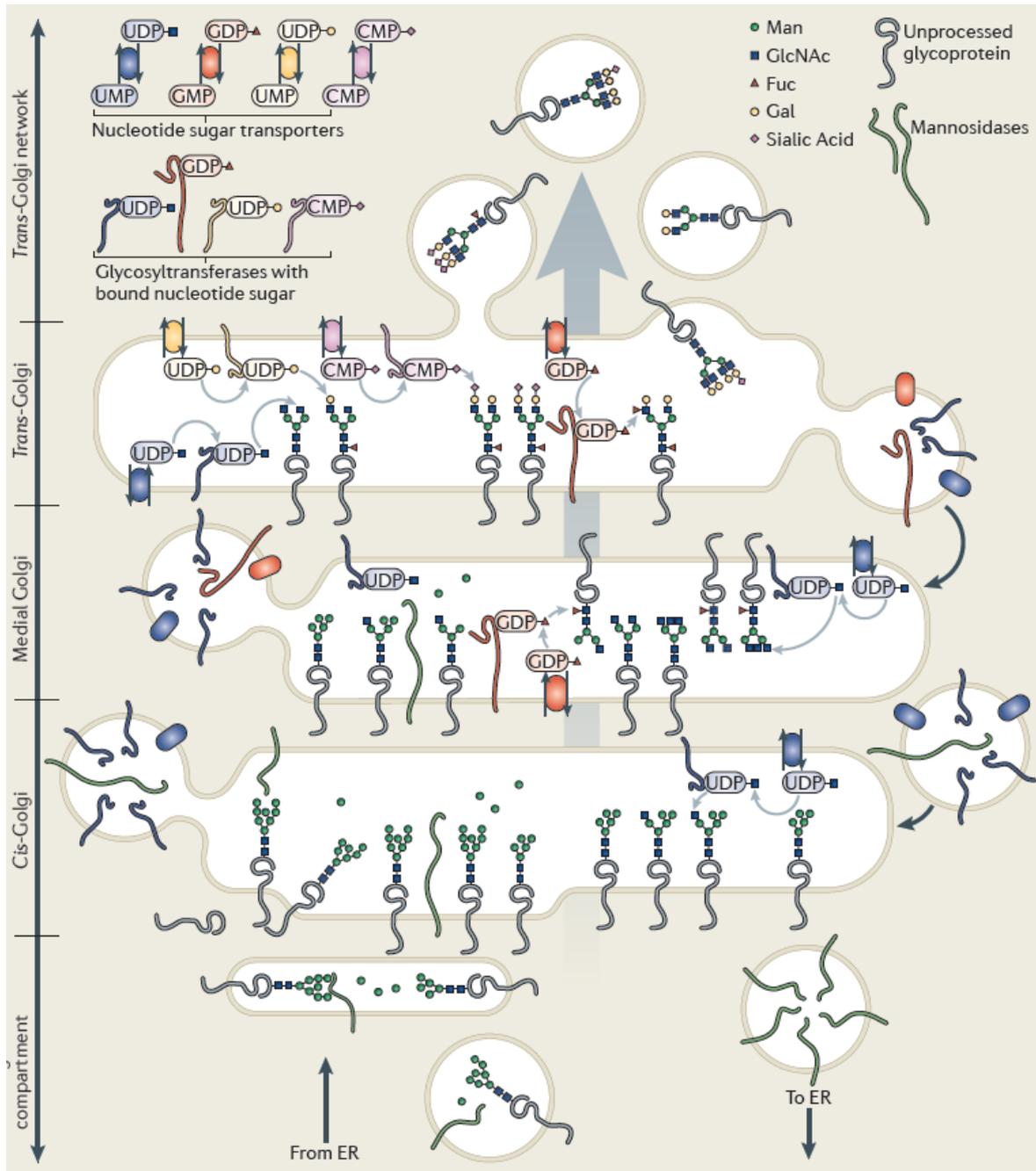


Figure 7 : Processus de maturation des *N*-glycannes dans le Golgi. Tiré de (Moremen, Tiemeyer et al. 2012) Illustration de la maturation golgienne des *N*-glycannes. Le cycle du bas vers le haut et de gauche vers la droite décrit l'évolution des structures *N*-glycanniques à travers les différentes saccules golgiennes du RE vers la membrane. La présence des glycosyltransférases, des mannosidases et des transporteurs de nucléotides-sucres est détaillée à l'intérieur des compartiments golgiens. Le transport vésiculaire rétrograde et antérograde permet de conserver la localisation spécifique des enzymes et transporteurs impliqués dans la *N*-glycosylation.

2.3 Biodiversité des N-glycannes :

La biodiversité des Ng de vertébrés est principalement exprimée sur les antennes et sucres périphériques des composés hybrides et complexes. Les différences d'expression des Ng se retrouvent à l'échelle des espèces, des individus, des organes, des tissus, des cellules et des protéines elles-mêmes. Au niveau d'une protéine, un même site consensus de N-glycosylation peut accueillir ou non un N-glycane et les N-glycannes présents sur un même site peuvent avoir des compositions différentes : on parlera respectivement de la macro-hétérogénéité et de la micro-hétérogénéité ([Hua, Nwosu et al. 2012](#)). Cette biodiversité est parfaitement illustrée dans un chapitre d'ouvrage de North ([North, Jang-Lee et al. 2010](#)) qui d'après les données de la banque glycanique du CFG (*Consortium of Functional Glycomics*) montre la répartition spécifique des structures N-glycanniques dans les organes et lignées cellulaires d'une souris Wild-Type (WT) C57/BI/6 (*Cf. Tableau 2*). Ce résumé des structures N-glycanniques présentes chez la souris montre une répartition uniforme des oligomannoses et des complexes, ainsi que des hybrides de manière minoritaire. Les Ng complexes semblent avoir une répartition organe-spécifique dépendante du nombre d'antennes, du type d'extension, de la fucosylation et de la présence de motifs antigéniques. Les connaissances précises sur la cartographie glycanique d'organismes entiers sont encore extrêmement rares et font appel à la reconstitution de profils glycaniques issus de banques de données ou d'analyses effectuées par différentes techniques et équipes de recherche. Cette vue d'ensemble sur les profils de glycosylation permet aux scientifiques d'imaginer les relations entre certaines structures glycaniques spécifiques et les propriétés et fonctions biologiques associées à un organe particulier. Ces cartes glycaniques permettent également de mieux comprendre les effets de la mutation de GT sur le développement et la fonctionnalité des organes.

		Observation in C57Bl/6 wild-type murine tissues and cell isolates													
Structural characteristics	Example of structure	Brain	Colon	Heart	Kidney	Liver	Lung	Ovaries	Pancreas	Small intestine	Spleen	Testes	Thymus	Neutrophils	Wehi-3
<i>N</i> -glycosylation (high mannose)															
High mannose		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>N</i> -glycosylation (hybrid)															
Hybrid structures		<i>m</i>	<i>m</i>	<i>m</i>	<i>m</i>	<i>m</i>	✓	<i>m</i>	<i>m</i>	<i>m</i>	<i>m</i>	<i>m</i>	<i>m</i>	<i>m</i>	<i>m</i>
<i>N</i> -glycosylation (complex)															
Heavily truncated structures		✓	<i>m</i>	✓	×	<i>m</i>	✓	<i>m</i>	✓	<i>m</i>	<i>m</i>	✓	×	<i>m</i>	<i>m</i>
Bi-antennary structures		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Tri-antennary structures		✓	✓	✓	✓	✓	✓	×	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Tetra-antennary structures		✓	✓	✓	✓	✓	✓	×	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Bisecting GlcNAc		✓	✓	✓	✓	×	✓	<i>m</i>	<i>m</i>	✓	<i>m</i>	<i>m</i>	<i>m</i>	×	<i>m</i>
Sialylation		✓ Only	×	✓	×	✓	✓	✓	<i>m</i>	✓	✓	✓	✓	✓	✓
LacNAc extensions		<i>m</i>	<i>m</i>	<i>m</i>	<i>m</i>	<i>m</i>	<i>m</i>	×	✓	×	×	<i>m</i>	<i>m</i>	✓	✓
Gal- α -Gal		<i>m</i>	✓	✓	×	<i>m</i>	✓	✓	✓	✓	✓	<i>m</i>	✓	✓	✓
Core fucose		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Lewis ^{x/a} (antennal fucose)		✓	✓	✓	✓	×	✓	<i>m</i>	✓	<i>m</i>	×	×	×	✓	×
Sialyl lewis ^{x/a}		×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	✓	×
Antennal Fuc (multiple)		✓	<i>m</i>	×	✓	×	<i>m</i>	×	✓	×	×	×	×	✓	×
Sd ^a		×	<i>m</i>	×	×	×	×	×	×	✓	×	×	×	×	✓

Tableau 2 : Tableau des *N*-glycannes de tissus et cellules de souris WT (C57Bl/6).

Les attributions sont basées sur des analyses de MALDI-TOF, MALDI-TOF/TOF et ESI-MS, et le détail des liaisons est en accord avec les voies de biosynthèses connues. (✓ → Présent, X → Absent, *m* → Présent et Minoritaire).

Ces résultats correspondent à un résumé des structures présentées dans la base de données du CFG

<http://www.functionalglycomics.org> Ce tableau est tiré de ([North, Jang-Lee et al. 2010](#))

2.4 Les fonctions des *N*-glycannes :

La *N*-glycosylation module les fonctions biologiques des protéines de manière très importante puisqu'elle influe sur la solubilité, la stabilité, la clairance, l'interaction cellules-cellules, la signalisation cellulaire, la reconnaissance, le repliement et l'activité enzymatique.

Les *N*-glycannes ont un caractère hydrophile important grâce à leurs groupements hydroxyles qui permettent à certaines protéines de rester solubles. Un exemple marquant de ce phénomène est la glycoprotéine de l'érythropoïétine (EPO) qui une fois dé-glycosylée est beaucoup moins soluble et s'agrège facilement ([Dordal, Wang et al. 1985](#)). La stabilité est une autre fonction assurée par la *N*-glycosylation, puisque sa présence sur les glycoprotéines diminue l'activité des certaines enzymes protéolytiques par l'encombrement de leurs sites de coupure. Par exemple, la création de trois sites de *N*-glycosylation supplémentaire sur l' α -

antitrypsine par mutagène dirigée contribue à augmenter sa durée de demi-vie de 62 % dans le sérum ([Lusch, Kaup et al. 2013](#)). D'autre part, la disparition par mutagène dirigée de sites de *N*-glycosylation de certaines enzymes a été effectuée pour comprendre l'impact de la *N*-glycosylation sur l'activité enzymatique. La suppression de chacun des trois sites de *N*-glycosylation de l' α -1,3-fucosyltransférase IX humaine (responsable de la formation du Le^X) provoque une diminution de 40% à 100% de l'activité enzymatique ([Seelhorst, Stacke et al. 2013](#)).

La clairance des glycoprotéines circulantes est principalement effectuée au niveau des cellules parenchymateuses du foie grâce aux récepteurs lectiniques de type-C d'Ashwell-Morell ([Ashwell and Morell 1974](#)) qui reconnaissent les asialoglycoprotéines et plus spécifiquement le Gal et le GlcNAc en position terminale. Plus récemment, il a été démontré que cette lectine pouvait aussi reconnaître l'acide sialique lié en α 2-6 sur les *N*-glycannes ([Park, Mi et al. 2005](#)).

La modulation de l'expression du gène de la GlcNAc-TIII responsable de la présence de GlcNAc intercalaire dans les Ng de souris a été testée pour comprendre son implication dans les processus physiopathologiques et son rôle dans les interactions cellules-cellules. La surexpression de la GlcNAc-TIII chez la souris produit des concentrations cinquante fois supérieures en GlcNAc intercalaire dans le foie qui perturbent les interactions cellules-cellules et la croissance cellulaire mais ne provoque pas de cancer au bout de 8 mois ([Stanley 2002](#)). En opposition, l'absence totale de la GlcNAc-TIII et de GlcNAc intercalaire chez la souris n'a pas de conséquence apparente sur le développement et la reproduction. Les souris qui n'expriment pas de GlcNAc intercalaire résistent beaucoup mieux aux agents chimiques carcinogènes du foie que les souris qui expriment la GlcNAc intercalaire ([Stanley 2002](#)). La GlcNAc intercalaire influe donc sur la prolifération cellulaire ([Miwa, Song et al. 2012](#)) par des mécanismes encore incertains.

La signalisation cellulaire est illustrée par la présence indispensable de *N*-glycannes sur plusieurs glycoprotéines hormonales hétéro-dimériques humaines : la Thyroestimuline (THS), la Lutéinisante (FH), la Folliculostimulante (FSH) et la gonadotrophine chorionique humaine (hCG). Ces hormones impliquées dans la gamétogenèse possèdent un ou deux sites de *N*-glycosylation qui assurent un rôle mineur dans la reconnaissance du récepteur hormonal et un rôle majeur dans la bio-activité hormonale. En effet, des hormones mutantes qui ont perdu leur(s) site(s) de *N*-glycosylation sont toujours capables de se lier aux récepteurs mais ne sont plus capables de les activer et agissent comme des antagonistes hormonaux ([Fares 2006](#)). Un autre exemple de l'implication de la *N*-glycosylation dans la signalisation est l'activation du récepteur Fc (FcalphaR) par l'Immunoglobuline A (IgA) puisque la mutation ou la dé-sialylation du site N58Q de *N*-glycosylation du récepteur Fc (FcalphaR) entraînent une augmentation significative de l'affinité de l'IgA pour ce récepteur ([Xue, Zhao et al. 2010](#)).

Chapitre 3 : Les O-glycannes de Vertébrés

3.1 Introduction :

La liaison O-glycannique de type mucine est issue de la réaction entre la fonction hémiacétalique d'une β -N-acétylgalactosamine avec la fonction alcool d'une sérine ou d'une thréonine. Cette réaction n'a pas de séquence consensus connue. Le type de O-glycanne se définit par la nature du monosaccharide lié à la protéine ; il en existe plusieurs : la O-GalNAc (protéines cellulaires et mucines), la O-GlcNAc (protéines nucléaires), la O-Xyl (protéoglycannes), la O-Glc et la O-Man (coagulation et facteur Notch). Cependant, la forme majoritaire de la O-glycosylation des vertébrés que nous avons étudiée et que nous allons maintenant définir est la O-GalNAc qui est retrouvée de manière importante sur les mucines et en moindre quantité sur glycoprotéines cellulaires. Le rôle des Og des mucines des vertébrés est de protéger les épithéliums en augmentant la viscosité du mucus qui permet de capturer de manière spécifique ou non des éléments étrangers afin de faciliter leur élimination ([Hollingsworth and Swanson 2004](#)). Les Og des protéines cellulaires assurent les rôles de signalisations et d'interactions moléculaires par la présence d'antigènes spécifiques comme les antigènes T, Tn, Sialyl-Tn ou de Lewis ([Cummings 2009](#)). La O-GalNAcylation débute exclusivement dans le Golgi sur des protéines repliées par le transfert d'une seule GalNAc en α 1-Ser/Thr par une polypeptide GalNAc transférase (ppGalNT) qui utilise de l'UDP-GalNAc comme substrat donneur. Le contrôle de l'étape d'initiation de la O-GalNAcylation est complexe puisque les gènes de la ppGalNacT sont présents sous 20 isoformes chez l'Homme et 18 isoformes chez le souris ([Tian and Ten Hagen 2009](#)). Ces gènes sont bien conservés chez les animaux (vertébrés et invertébrés) ([Bennett, Mandel et al. 2012](#)) qui utilisent la O-GalNAcylation pour la glycosylation de leurs protéines. *A contrario*, la O-GalNAcylation ne semble pas être présente chez les bactéries ([Iwashkiw, Vozza et al. 2013](#)), les plantes ([Castilho, Neumann et al. 2012](#)) et les champignons ([Goto 2007](#)). L'initiation golgienne de la O-GalNAcylation est une étape fondamentale, puisqu'elle conditionne l'action de glycosyltransférases sur la structure de GalNAc-Ser/Thr pour former au moins huit noyaux différents chez les vertébrés (*cf.* Figure 8) ([Hounsell, Davies et al. 1996](#)). Les noyaux 1 à 4 sont les plus répandus chez les vertébrés par rapport aux noyaux 5 à 8 ([Hounsell, Lawson et al. 1985](#); [Yazawa, Abbas et al. 1986](#); [van Halbeek, Strang et al. 1994](#)) qui sont extrêmement rares. Cependant, cette classification en noyaux n'est valable que chez les vertébrés, puisque le peu d'informations structurales disponibles sur l'O-GalNAcylation des invertébrés révèlent de nombreuses différences nucléaires ([Maes, Garenaux et al. 2005](#); [Aoki, Porterfield et al. 2008](#); [Garenaux, Maes et al. 2011](#); [Stepan, Pabst et al. 2012](#)). Tous les noyaux de la O-GalNAcylation subissent un processus d'élongation par l'ajout de LacNAc ou de LacdiNAc. Ensuite un processus de glycosylation terminale greffe des unités de fucoses, d'acides sialiques et de sulfates générant ainsi une importante diversité structurale.

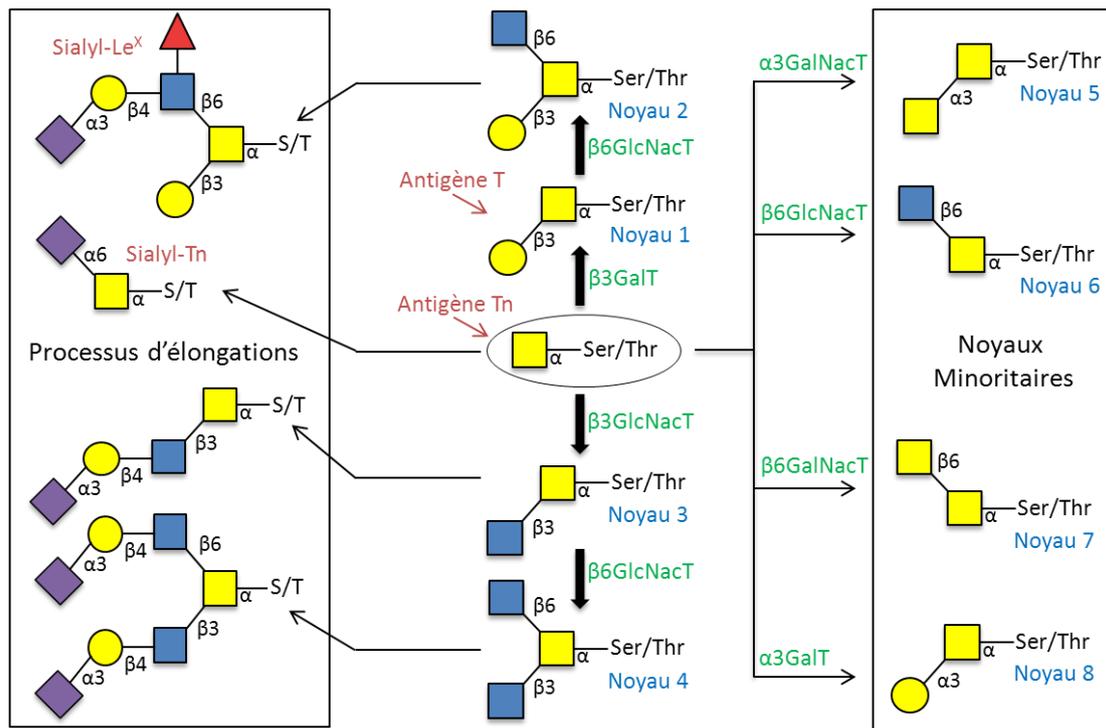


Figure 8 : Présentation des noyaux *O*-glycanniques de vertébrés

Illustration structurale des 8 noyaux des *O*-glycannes des vertébrés (en bleu) et des enzymes (en vert) responsables de leurs synthèses au niveau du Golgi. Plusieurs exemples d'élongations et de périphéries de la glycosylation (sur la gauche). Les antigènes T, Tn, Sialyl-Tn et Sialyl-Le^x sont illustrés en rouge.

3.2 Biosynthèse des *O*-glycannes de type Mucine :

La biosynthèse des Og de type mucine suit les mêmes étapes d'initiation, d'élongation et de terminaison que les Ng, mais se déroule exclusivement dans le Golgi. L'étape d'initiation a lieu dans le cis-Golgi par l'action d'une ppGalNAc-T sur les polypeptides repliés pour fixer une unité de GalNAc sur une Ser/Thr. Les différentes ppGalNAc-T présentent des spécificités de substrats accepteurs et de localisation tissulaire qui ont été mises en évidence au cours du développement de la drosophile (*Drosophila melanogaster*) ; de plus, certaines ppGalNAc-T sont indispensables au développement normal de la drosophile (Tian and Ten Hagen 2006; Tran, Zhang et al. 2012). Durant cette étape d'initiation, plusieurs enzymes golgiennes peuvent intervenir pour former les différents noyaux des Og (cf. Tableau 3) grâce à l'ajout séquentiel de monosaccharides issus des nucléotides-sucres (Wopereis, Lefeber et al. 2006). Les enzymes suivantes interviennent dans la synthèse des principaux noyaux des *O*-glycannes et sont résumées dans le tableau 3 : C1GalT-1, C2GnT-1, C2GnT-3, C2GnT-2, C3GnT-1 et C2GnT-2 (Fukuda 2002). Suite à la biosynthèse des noyaux, le processus d'élongation va apporter des motifs LacNAc de type 1 (Galβ1-4GlcNAc) ou de type 2 (Galβ1-3GlcNAc) qui constituent la majorité des antennes des *O*-glycannes. Enfin, le processus de glycosylation terminal intervient dans le trans-Golgi où certaines enzymes ajoutent les éléments terminaux suivants : fucose, Neu5Ac, Neu5,9Ac₂, Neu5,7,9Ac₃, ainsi

que des groupements sulfatés. Dans les Og de type mucine, Le sulfate est principalement en position 3 sur le Gal et en position 6 sur la GlcNAc ([Suzuki, Hiraoka et al. 2001](#); [Kawashima 2012](#)), alors que l'acide sialique se trouve souvent en position 3 ou 6 sur le Gal et en position 6 sur la GlcNAc ([Guzman-Aranguez and Argueso 2010](#)).

Tableau 3 : Enzymes responsables de la synthèse des principaux noyaux des O-glycannes de mammifères.

Noyaux	Structures	Enzymes
Tn-Antigen	GalNAc α -S/T	Polypeptide N-acetylgalactosaminyl-Tf (ppGalNAcTs)
Noyaux 1	Gal β 1-3GalNAc α -S/T	Core 1 β 1-3 galactosyl-Tf (C1GalT-1 or T synthase) Core 1 α 2-3 sialyl-Tf (ST3Gal I, ST3Gal IV)
Noyaux 2	GlcNAc β 1-6(Gal β 1-3)GalNAc α -S/T	Core 2 β 1-6 N-acetylglucosaminyl-Tf (C2GnT-1, C2GnT-3) Core 2/4 β 1-6 N-acetylglucosaminyl-Tf (C2GnT-2)
Noyaux 3	GlcNAc β 1-3GalNAc α -S/T	Core 3 β 1-3 N-acetylglucosaminyl-Tf (C3GnT-1)
Noyaux 4	GlcNAc β 1-6(GlcNAc β 1-3)GalNAc α -S/T	Core 3 β 1-3 N-acetylglucosaminyl-Tf (C3GnT-1) Core 2/4 β 1-6 N-acetylglucosaminyl-Tf (C2GnT-2)

3.3 Biodiversité des O-glycannes :

La biodiversité des Og se manifeste aux différents niveaux d'organisation des êtres vivants et a été principalement étudiée chez les mammifères, même si plusieurs études sur les Og des invertébrés et des procaryotes commencent à émerger. On s'aperçoit que la O-glycosylation des deux groupes présente des différences claires. Par exemple, les Ogs de vertébrés sont généralement hautement sialylés (*cf.* Tableau 4) alors que ceux des invertébrés ne porte pas ou peu d'acides sialiques ; ils utilisent d'autres substituants comme l'acide glucuronique *Drosophila melanogaster* ([Aoki, Porterfield et al. 2008](#)) et *Caenorhabditis elegans* ([Palaima, Leymarie et al. 2010](#)), ou le 2-amino-éthylphosphate (*Vespa germanica*) ([Maes, Garenaux et al. 2005](#)). De plus, les noyaux des Og des invertébrés sont variables selon l'espèce : *Drosophila megalogaster* (Tn, Noyau 1, GlcA-Noyau 1, Noyau 2), *Vespa germanica* (Tn, Noyau 1, Noyau 2, Etn-P-(O-6)-GalNAc-ol, Etn-P-(O-6)-Noyau 1) et *Arion lusitanicus* ((Me-4-Gal)-1,3(((Me-4-Gal)-1,6]-GalNAc-ol). Ces données structurales des Og de mucine suggèrent une incroyable diversité structurale chez les invertébrés et notamment chez les insectes qui représentent plus de 75 % des espèces animales.

La biodiversité des Og de mucine des vertébrés est illustrée au sein de différentes classes animales : les mammifères (humain et souris - CFG (Consortium for Functional Glycomics)), les oiseaux (*Collocalia* ([Wieruszkeski, Michalski et al. 1987](#))) et les amphibiens (*Triturus alpestris* ([Florea, Maes et al. 2006](#)) et *Rana clamicans* ([Delplace, Maes et al. 2002](#))). Ces données structurales montrent la distribution des structures des Og de mucines dans les

différentes classes des animaux et mets en lumière l'évolution de ces structures glycaniques.

Les variations d'expression des Og de mucine au sein des souris WT C57/BI/6 sont résumées dans un article de chapitre qui présente les données dans le CFG et qui illustre le caractère organe-spécifique des Og de mucine chez la souris. Ces données montrent par exemple que le noyau 1 et sa sialylation semblent être ubiquitaires dans l'organisme à l'exception du foie. D'autre part, le noyau 2 est également présent dans tous les organes sauf le foie, les ovaires et le pancréas. Le noyau 2 est le support de motif glycanique comme l'extension LacNAc, la liaison Gal- α -Gal et des antigènes (Le^x, SLe^x et Sd^a) qui ont une répartition organe-spécifique.

		Observation in C57BI/6 wild-type murine tissues and cell isolates													
Structural characteristics	Example of structure	Brain	Colon	Heart	Kidney	Liver	Lung	Ovaries	Pancreas	Small intestine	Spleen	Testes	Thymus	Neutrophils	WeHi-3
Core-1 O-glycosylation															
Core-1		✓	✓	✓	✓	✗	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Sialylated core-1		✓	✓	✓	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Core-2 O-glycosylation															
Core-2		✓	✓	✓	✓	✗	✓	✗	✗	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Sialylated core-2		✗	✗	✗	✓	-	✗	-	-	✓	✓	✗	✓	✓	✓
Lewis ^x (antennal fucose)		✓	✓	✗	✓	-	✓	-	-	✓	✓	✓	✓	✓	✗
Fucosylation and sialylation		✗	✗	✗	✓	-	✗	-	-	✓	✗	✗	✗	<i>m</i>	✗
Sialyl lewis ^x		✗	✗	✗	✗	-	✗	-	-	✗	✗	✗	✗	<i>m</i>	✗
LacNAc extensions		✗	✓	✗	✓	-	✗	-	-	✓	✓	✗	✓	✓	✓
Sd ^a		✗	✗	✗	✗	-	✗	-	-	✓	✗	✗	✗	✗	✓
Gal- α -Gal		✗	✗	✗	✗	-	✗	-	-	✓	✓	✗	✓	✓	✓

Tableau 4 : Tableau des O-glycannes de tissus et cellules de souris WT (C57BI/6).

Les attributions sont basées sur des analyses de MALDI-TOF, MALDI-TOF/TOF et ESI-MS, et le détail des liaisons est en accord avec les voies de biosynthèses connues. (✓ → Présent, ✗ → Absent, *m* → Présent et Minoritaire, - → impossible de conclure). Ces résultats correspondent à un résumé des structures présentées dans la base de données du CFG <http://www.functionalglycomics.org>. Ce tableau est issu de (North, Jang-Lee et al. 2010).

3.4 Fonctions associées aux O-glycannes :

Les fonctions des structures glycaniques sont généralement explorées par inhibition d'une ou plusieurs glycosyltransférases spécifiques de la biosynthèse de ces structures, leurs conséquences physiologiques sont ensuite finement analysées. Cette stratégie s'applique par la réalisation de mutants stables par recombinaison génétique grâce aux techniques de TALENs ou par mutation transitoire par l'utilisation de siRNA ou de Morpholino ([Bill, Petzold et al. 2009](#)) à différents stades de développement embryonnaire ou adulte. A titre d'exemple, le ppGalNAcT-1 ou ppGalNAcT-1 « like » est l'isoforme la plus répandue et la plus exprimée chez les animaux. Elle a été inactivée de manière stable chez la Souris ([Tenno, Ohtsubo et al. 2007](#)) et le Xénope, la mutation ne s'est pas révélée létale mais a entraîné des problèmes physiologiques tels qu'un caractère hémophile par une diminution des facteurs de coagulation sérique, une perturbation immunitaire par réduction des IGG et des lymphocytes B du plasma, une altération au niveau du trafic/localisation des lymphocytes sériques, ainsi qu'une diminution du TGF- β . Le caractère non létal de la mutation de certaines ppGalNAc-T est dû aux isoformes géniques qui assurent un contrôle sur l'expression et la localisation de ces glycosyltransférases au cours du développement et permettent une expression basale des structures de O-GalNAc ([Tian and Ten Hagen 2006; Tran, Zhang et al. 2012](#)). D'autres glycosyltransférases comme la β 3-GalT qui synthétise le noyau 1 (antigène T) a également été inactivée chez la souris et a produit un caractère létal au stade embryonnaire de 14 dpf (*day post fertilization*) par hémorragie cérébrale ([Xia, Ju et al. 2004](#)). Ces résultats suggèrent fortement que les noyaux de type 1 et/ou 2 sont impliqués dans les processus du développement micro-vasculaire et de l'angiogenèse cérébrales des stades embryonnaires. Ces résultats nécessitent une confirmation supplémentaire puisque le phénotype observé en l'absence de β 3-GalT fonctionnelle pourrait également provenir de l'accumulation d'antigènes Tn et des noyaux 3/4. Le caractère létal de cette mutation s'explique par le fait que cette β 3-GalT ne possède pas d'isoforme et inhibe complètement la synthèse des noyaux 1 et 2. Le caractère fondamental de cette modification glycanique des protéines est maintenant clair et nécessite une étude structurale approfondie au sein de lignées cellulaires et tissulaires, des études génétiques fonctionnelles séquentielles des glycosyltransférases et une analyse métabolique de la mise en place de cette glycosylation au cours du développement.

Chapitre 4 : Les Glycosphingolipides

4.1 Introduction :

Les glycosphingolipides (GSL) sont les constituants majeurs des glycolipides eucaryotes et se composent d'une partie glycanique et d'une partie lipidique appelée « céramide ». La classification des glycannes des GSL est basée sur des noyaux différents ([Chester 1998](#)), et se compose de sept séries : Gala, Ganglio, Globo, Isoglobo, Lacto, Neolacto, Muco (cf.

Tableau 5). Malgré un nombre important de séries glycaniques, seules les séries suivantes sont retrouvées en majorité chez les vertébrés : Ganglio, Lacto, neoLacto et Globo et isoGlobo. Ces cinq séries glycaniques sont constituées initialement d'un groupe lactose Gal β 1,4Glc qui est lié en β sur l'hydroxyle 1 du céramide. Le céramide (cf Figure 9) est une association entre une base sphingoïde (LCB) est un acide gras (AG) *N*-acylé.

Une nomenclature complète et simplifiée est développée en collaboration entre l'Union Internationale de Pureté et de Chimie Appliquée (IUPAC) et l'Union Internationale de Biochimie et de Chimie Moléculaire (IUBMC) pour décrire l'ensemble des lipides ([Fahy, Subramaniam et al. 2005](#)). Cette nomenclature internationale a été usitée pour décrire les structures des glycosphingolipides. Les acides gras (AGs) sont désignés en fonction du nombre de carbones, d'hydroxyles et d'insaturations qui les composent. Par exemple, le C16:0 est un acide palmique saturé à 16 atomes de carbone et le C24:1 est un acide nervonique qui possède 1 insaturation et 24 atomes de carbone. Les bases sphingoïdes sont des 2-amino-di-1,3-hydroxy-alkanes ou alcènes, qui ont des carbones asymétriques (S/R) et des positions cis/trans pour leurs doubles liaisons (Z/E). La (2S,3R,4E)-2-amino-4-octadecen-1,3-diol ou 4E-sphingénine est la base sphingoïde la plus abondante dans le règne animal. Un dérivé important des bases sphingoïdes est la phytosphingosine ou 4-hydroxy-sphinganine(2S,3R,4R)-2-amino-octadecanetriol qui diffère de la 4E-sphingénine, puisque cette base lipidique est saturée et possède un hydroxyle supplémentaire en position C₄ qui forme un carbone asymétrique de plus. Une nomenclature simplifiée des bases sphingoïdes tient compte du nombre d'hydroxyles, de carbones et d'insaturations. Ainsi, la 4-sphingénine et la phytosphingosine peuvent respectivement se nommer d18:1 (d=dihydroxy, 18=nombre de carbones et 1=nombre d'insaturation) et t18:0 (t=trihydroxy, 18=nombre de carbones et 0=nombre d'insaturation). La dénomination des céramides tient compte des deux nomenclatures précédentes et se désigne en juxtaposant la base sphingoïde et l'acide gras de la manière suivante LCB-AG. Par exemple, le d18:1-C16:0 désigne un céramide constitué d'une 4-sphingénine et d'un acide palmitique. La diversité des GSL s'exprime par de nombreuses structures glycaniques associées à plusieurs types de céramides différents. Ces nombreuses structures génèrent des antigènes spécifiques et des fonctions particulières.

Nous allons maintenant définir en détails la biosynthèse, la structure, la diversité et les fonctions associées de la partie lipidique et glycanique des GSL.

Tableau 5 : Les séries des GSL des eucaryotes supérieurs.

Séries	Symboles	Structure des noyaux
Gala	Ga	Gal α 1,4Gal β 1,1'Cer
Ganglio	Gg	Gal β 1,3GalNAc β 1,4Gal β 1,4Glc β 1,1'Cer
Globo	Gb	GalNAc β 1,3Gal α 1,4Gal β 1,4Glc β 1,1'Cer
Isoglobo	iGb	GalNAc β 1,3Gal α 1,3Gal β 1,4Glc β 1,1'Cer
Lacto	Lc	Gal β 1,3GlcNAc β 1,3Gal β 1,4Glc β 1,1'Cer
Neolacto	nLc	Gal β 1,4GlcNAc β 1,3Gal β 1,4Glc β 1,1'Cer
Muco	Muco	Gal β 1,3Gal β 1,3Gal β 1,4Glc β 1,1'Cer

4.2 Biosynthèse des Glycosphingolipides :

4.2.1 Biosynthèse du céramide :

La biosynthèse du céramide commence à l'intérieur du RE (*cf.* Figure 9) par le transfert d'une L-Sérine sur un palmitoyl-CoA par la sérine-palmitoyl-CoA transférase, formant la 3-ketosphinganine qui est ensuite réduite en sphinganine par la 3-ketosphinganine réductase. La sphinganine est ensuite *N*-acylée par un acide gras (AG) grâce à l'une des six Céramides Synthésases (CerS) présentes chez les mammifères, ces enzymes ont chacune leur propre localisation ([Kremser, Klemm et al. 2013](#)) et leur propre affinité envers les acides gras et leurs dérivés insaturés ou hydroxylés. Cette réaction enzymatique crée un dihydro-céramide constitué d'un acide gras et d'une sphinganine saturée qui peut être dé-saturée par la dihydro-céramide- Δ 4-désaturase et/ou la dihydro-céramide- Δ 8-désaturase. Cependant, les formes saturées et insaturées de la base lipidique sont toutes couramment appelées « céramides » et leurs distinctions sont faites par des précisions entre parenthèses. Par exemple, les céramides (d18:1-C16:0) ou (d18:0-C16:0) portent tous deux un acide gras saturé de type palmitique (C16:0) et une sphingénine (d18:1) pour l'un et une sphinganine (d18:0) pour l'autre. La phytosphingosine a un hydroxyle supplémentaire sur son C₄ issu de l'hydroxylation enzymatique de la 4-*erythro*-sphingénine, qui nécessite du NADPH comme source énergétique ([Wright, Snow et al. 2003](#)). Les céramides néo-synthétisés dans le RE sont transportés dans le Golgi par une protéine de transport lipidique (CERT) ([Hanada, Kumagai et al. 2003](#)) afin de les transformer par les enzymes Golgiennes en sphingomyéline, sphingosine-1-phosphate ou en glycosphingolipides. Nous allons nous intéresser particulièrement aux glycosphingolipides dans la suite de cet exposé.

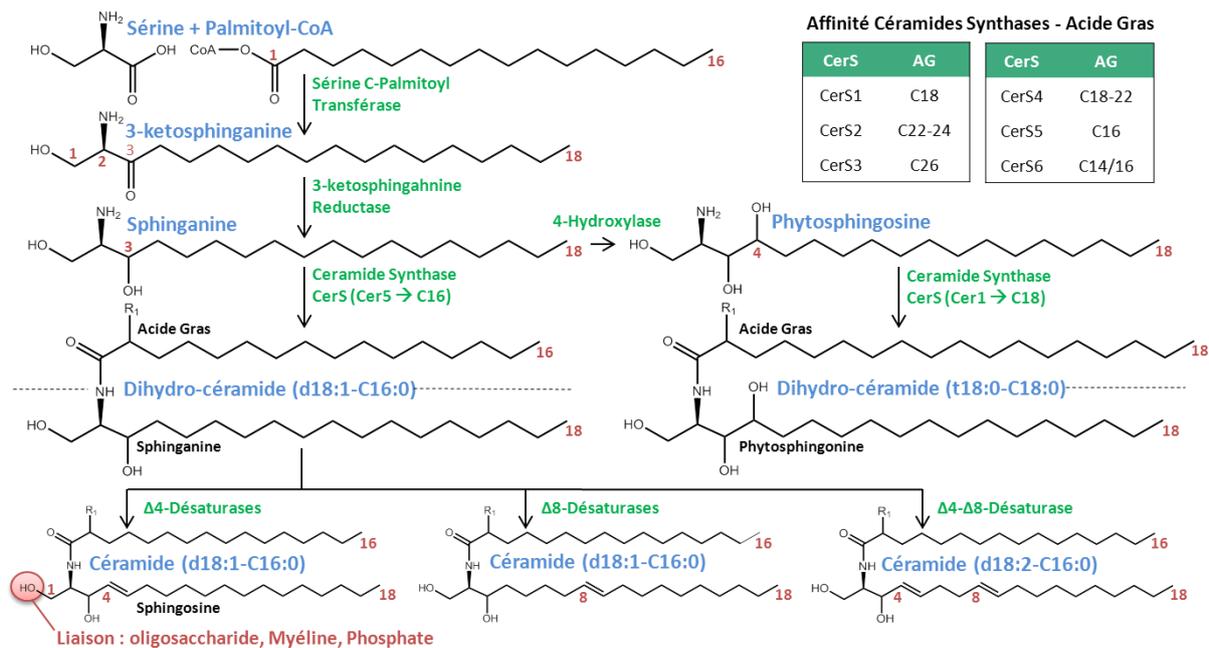


Figure 9 : Processus de biosynthèse de céramides chez les vertébrés.

La biosynthèse des céramides est détaillée à partir l'association entre la sérine et le palmitoyl-CoA. Les noms des molécules sont indiqués en bleu alors que ceux des enzymes sont indiqués en vert.

4.2.2 Biosynthèse de la partie glycanique :

La liaison glycosidique des GSL est réalisée chez les vertébrés entre l'hydroxyle réducteur d'un β -Gal ou d'un β -Glc avec l'hydroxyle en position C₁ du céramide. Cette liaison osidique est catalysée par des enzymes non-redondantes de la *Galactosyl-Ceramide Synthase* et la *Glucosyl-Ceramide Synthase*, qui forment respectivement le GalCer et le GlcCer en utilisant des nucléotides-sucres comme substrats donneurs. Le GalCer est synthétisé directement à l'intérieur du Golgi contrairement au GlcCer, qui est synthétisé sur la face cytosolique du Golgi puis bascule à l'intérieur. Ces structures sont essentielles à la formation de GSL plus complexes par l'action séquentielle de glycosyltransférases golgiennes spécifiques ([Maccioni, Quiroga et al. 2011](#)) (cf. Figure 10). Le GalCer est utilisé pour former différentes molécules : le Sulfo(3)-GalCer (sulfo-Tf), le Sialyl-GalCer (sialyl-T) ou la série Gala (α 1,4-Gal-T). Le GlcCer est à l'origine de 90% des GSL de mammifères ; il est utilisé pour former du Sialyl-GlcCer et du Lactosyl-Ceramide (LacCer) par la *Lactosyl-Ceramide-Synthase* (LCS) qui est une β 1-4GalT6. Le LacCer est l'élément central de la biosynthèse des GSL majeurs de vertébrés puisqu'il est à l'origine de la synthèse des séries suivantes : les Gb, les iGb, les Gg, les Lc, les nLc et les muco. L'initiation de ces séries provient de l'extension du LacCer par des glycosyltransférases particulières (cf. Tableau 6) : les Gb [α 1-4Gal-T (Gb3S)], les iGb [α 1-3GalT (Gb3S)], les Gg [(β 1-4GalNAc-T (GA2S) ou α 2-3Sia-T (GM2S)], les Lc et les nLc [β 1-3GlcNAc-T] et les muco [β 1-3Gal-T]. Ensuite d'autres glycosyltransférases achèvent la formation des différentes séries de GSL à partir du LacCer (R) : les Gb (GalNAc β 1,3Gal α 1,4-

R), les iGb (GalNAc β 1,3Gal α 1,3), les Gg (Gal β 1,3GalNAc β 1,4-R), les Lc (Gal β 1,3GlcNAc β 1,3-R), les nLc (Gal β 1,4GlcNAc β 1,3-R) et les muco (Gal β 1,3Gal β 1,3-R). Deux autres séries utilisent le GlcCer (R') dans leurs GSL chez les invertébrés : les Arthro (GlcNAc β 1,3Man β 1,4-R') découverts chez les Arthropodes ([Sugita, Nishida et al. 1982](#); [Dennis, Geyer et al. 1985](#)) et les Mollu (Man α 1,3Man β 1,4-R') découverts chez les Mollusques ([Sugita, Nakano et al. 1984](#)).

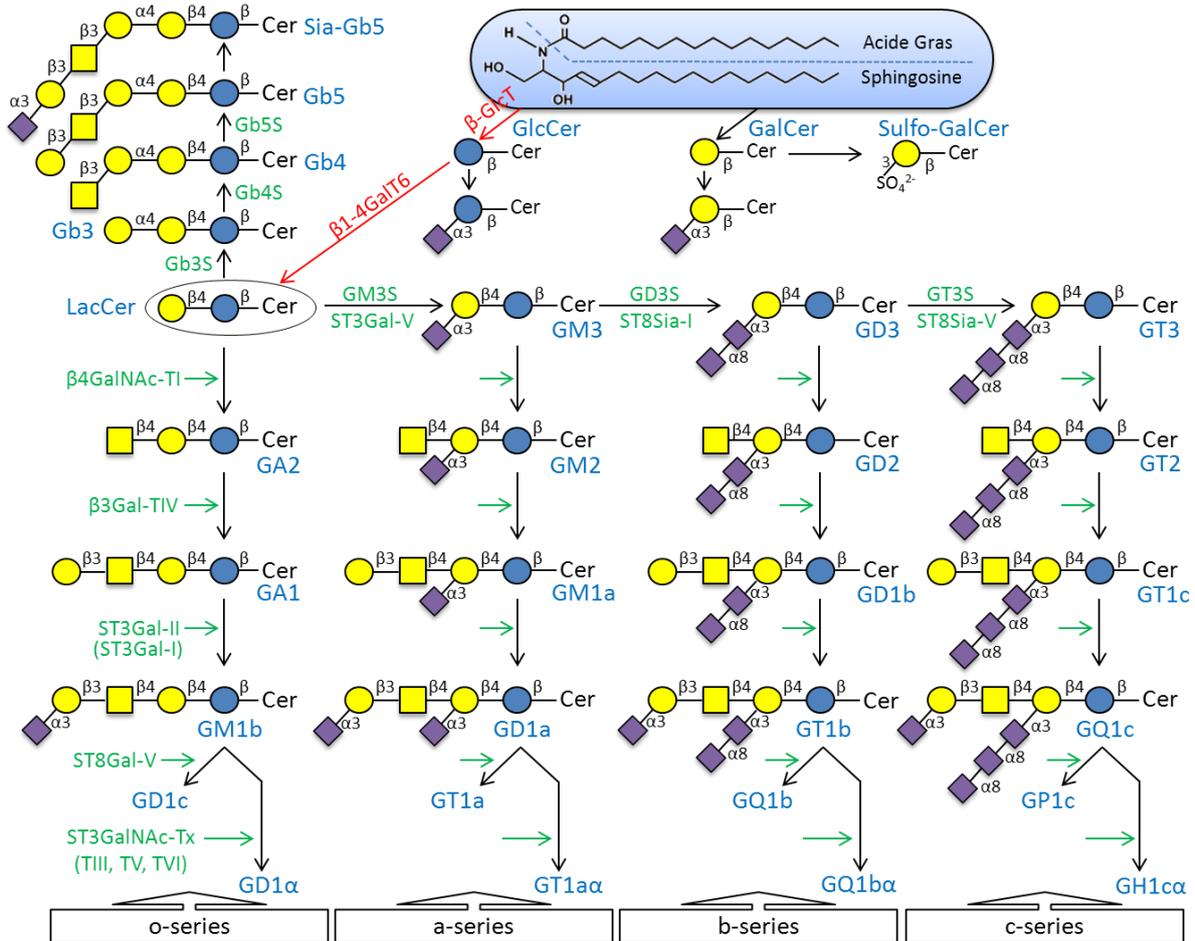


Figure 10 : Schéma de biosynthèse des principaux glycosphingolipides de vertébrés.

Biosynthèse des principaux glycosphingolipides de vertébrés à partir du céramide néo-synthétisé. La structure centrale indispensable à la synthèse de gangliosides et de globosides est le Lactosylcéramide (LacCer). Les noms des molécules sont indiqués en bleu alors que ceux des enzymes sont indiqués en vert.

Tableau 6 : Noms communs, gènes et substrats accepteurs de la biosynthèse des gangliosides.
Les structures de R peuvent être de types : GA3, GM3, GD3 ou GT3.

Gènes	Nom Commun	Substrat Accepteur
<i>UGCG</i>	GlcCer Synthétase	Cer
<i>UTG8</i>	GalCer Synthétase	Cer
<i>GAL3ST-1</i>	Sulfo-GalCer Synthétase	GalCer
<i>β4GalT-6</i>	LacCer Synthétase	GlcCer
<i>ST3GAL-5</i>	GM3 Synthétase	LacCer
<i>ST8Sia-1</i>	GD3 Synthétase	GM3, GD3
<i>ST8Sia-5</i>	GT3 Synthétase	GA3, GM3, GD3, GT3
<i>β3GalNAcT-1</i>	GM2/GD2 Synthétase	GA3, GM3, GD3, GT3
<i>β3GalT-4</i>	GM1a/GD1b Synthétase	GA2, GM2, GD2, GT2
<i>ST3Gal-1</i>	ST3Gal-I	Galβ1-3GalNAcβ1-4-R
<i>ST3Gal-2</i>	ST3Gal-II	Galβ1-3GalNAcβ1-4-R
<i>ST6GalNAc-3</i>	ST6GalNAc-III	Neu5Acα2-3Galβ1-3GalNAcβ1-4-R
<i>ST6GalNAc-5</i>	ST6GalNAc-V	Neu5Acα2-3Galβ1-3GalNAcβ1-4-R
<i>ST6GalNAc-6</i>	ST6GalNAc-VI	Neu5Acα2-3Galβ1-3GalNAcβ1-4-R

4.3 Rôles, fonctions et pathologie des glycosphingolipides :

Les fonctions associées aux GSL ([Lingwood 2011](#)) sont cruciales : développement, inflammation, transport, prolifération, reproduction et signalisation cellulaire. La découverte de ces fonctions est relativement cryptique à cause de la difficulté à relier une fonction précise du sucre ou du céramide avec un phénomène biologique précis dans un environnement dynamique. Bien que la description structurale de la sphingosine par Tudichum en 1884 soit relativement précoce, les analyses fonctionnelles des GSL ont commencées au cours des années 1990. Les analyses fonctionnelles sont basées sur la dérégulation des enzymes du métabolisme des GSL ou sur l'observation par microscopie de l'organisation des GSL. Les conséquences du dérèglement du métabolisme des GSL ont été observées chez des souris KO pour les enzymes-clés de la biosynthèse des séries de GSL ou chez l'humain lors d'une déficience héréditaire dans le catabolisme des GSL conduisant à l'accumulation d'un GSL. Nous allons détailler dans cette partie plusieurs fonctions attribuées aux GSL de vertébrés.

Les effets d'une déficience totale (GlcCer) ou partielles des GSL (GalCer, LacCer, Gg, Gb, Lc, nLc), ont été étudiés par inhibition ou mutation des enzymes impliquées de biosynthèse. Des embryons et des cellules souches embryonnaires de souris KO pour le gène de la GlcCer synthétase ont induit une absence totale de GlcCer et de ses structures dérivées. Le mutant embryonnaire homozygote présente une quantité de céramide membraniare seul plus importante et un caractère létal après 7,5 jours de développement à cause d'une désorganisation tissulaire de l'ectoderme ([Yamashita, Wada et al. 1999](#)). Le KO de la GM2/GD2 synthétase chez la souris induit une disparition totale des gangliosides GA2,

GM2, GD2 et de leurs dérivés mais augmente les quantités de GM3 et de GD3. Les souris mutantes se développent normalement jusqu'à l'âge adulte mais acquièrent des déficiences dans la régénération du tissu cérébrale, la régulation du récepteur de l'interleukine-2 et le transport de la testostérone ([Furukawa and Takamiya 2002](#)). Un KO pour la GM3 synthase chez la souris induit la disparition du GM3 et de ses dérivés (GD1c, a-series, b-series et c-series) mais augmente les quantités de GM1b, GD1 α (o-series). La souris se développe normalement jusqu'à l'âge adulte, et elle est fertile. Cependant, la souris est hypersensible à l'insuline puisque le GM3 agit comme un régulateur négatif de la signalisation du récepteur de l'insuline ([Yamashita, Hashiramoto et al. 2003](#)). Les souris déficientes en GM2 et GM3 synthétases ne produisent aucun ganglioside et montrent une dégénérescence sévère du système nerveux central et une perturbation des interactions cellulaires axones-gliales entraînant un caractère létale précoce à 6 semaines après la naissance en moyenne ([Yamashita, Wu et al. 2005](#)). Des souris incapables de synthétiser la série Gb ont été obtenues par la recombinaison homologue du gène de l' α 1,4GalT pour obtenir les mutants α 1,4GalT^{-/-}. Les mutants α 1,4GalT^{-/-} se développent normalement jusqu'à l'âge adulte et ne présentent aucun trouble lors des analyses sanguines, sériques, urinaires et fécales. De plus, les mutants α 1,4GalT^{-/-} sont moins sensibles aux véro-toxines bactériennes, ce qui implique un mécanisme de reconnaissance spécifique entre la série Gb et ces toxines ([Okuda, Tokuda et al. 2006](#)). Les souris KO pour la céramide galactosyltransférase et la GalCer Sulfo-transférase (GCS) indiquent que ces enzymes et leurs produits sont requis pour la formation de paranode dans la gaine axonale et la spermatogenèse ([Honke, Hirahara et al. 2002](#)). La GCS est un régulateur négatif de la différenciation des oligodendrocytes en myéline ([Boggs, Gao et al. 2008](#)), la perte de Sulfo-GalCer entraîne une diminution progressive de la conductivité de la myéline induisant une paralysie chez la souris ([Coetzee, Fujita et al. 1996](#)).

De nombreuses pathologies humaines sont issues de problèmes héréditaires de dégradation d'oligosaccharides par des glycosidases spécifiques ; ces dysfonctionnements cataboliques entraînent généralement pour les GSL des maladies de surcharge lysosomale (LDG) ([Grabowski 2012](#)). Plusieurs LDG ont déjà été clairement identifiées : les maladies de Sandhoff et Tay-Sachs (Gangliosidoses de type GM2), la maladie de Fabry (Gb3), la maladie de Gaucher (GlcCer), la maladie de Krabbe (GalCer) et la leucodystrophie multiple (Sulfo-GalCer). La maladie de Fabry ([Germain 2010](#)) est provoquée par mutation de l' α -galactosidase présent sur le chromosome X, qui entraîne une accumulation importante de Gb₃ dans le lysosome. L'accumulation de Gb₃ (antigène P^k) entraîne principalement des problèmes des troubles d'insuffisances rénales et cardiaques, des dermatopathies et des neuropathies. La maladie de Gaucher ([Grabowski 2012](#)) affecte le gène *GBA* de la β -gluco-cérébrosidase acide ou le gène *PSAP* de la pro-saponine, qui active après clivage la β -gluco-cérébrosidase acide. Ces mutations autosomales récessives inhibent l'activité de la β -gluco-cérébrosidase acide et entraîne l'accumulation du GlcCer. La maladie de Gaucher provoque des symptômes variables : hépatosplénomégalie, problèmes pulmonaires, anémie, problèmes inflammatoires, neuro-dégénération et problèmes osseux. La maladie de

Sandhoff ([Sakuraba, Matsuzawa et al. 2002](#)) est provoquée par des mutations dans le gène *Hex-B* du chromosome 5 responsable formation de la sous-unité β dans les β -hexosaminidases A ($\alpha\beta$) et B ($\beta\beta$). Ces mutations inhibent l'activité des β -hexosaminidases qui entraînent une accumulation de GM2 dans les organes et notamment dans le système nerveux central et périphérique. La présence anormalement élevée de GM2 dans le cerveau entraîne une dégénérescence neuronale associée à une déficience motrice et visuelle progressive. Cette maladie est asymptomatique durant les premiers mois de la vie, mais ces symptômes se développent rapidement dans la forme infantile de la maladie et conduisent à une mort précoce à environ 4 ans. Cependant, un lien étroit existe entre le cholestérol et les GSL puisque les LSD (sauf GD) entraînent une accumulation de cholestérol dans le lysosome et une perturbation importante du trafic rétrograde des GSL ([Pagano 2003](#)) qui peut être mis en évidence par un fluorophore : le BODIPY-LacCer ([Chen, Patterson et al. 1999](#)). Cette augmentation de cholestérol dans le lysosome lors de LSD est corrélée à une diminution de sa présence dans le RE ([Puri, Jefferson et al. 2003](#)) ; la déplétion de l'excès de cholestérol dans les cellules LSD améliore le trafic des GSL ([Puri, Watanabe et al. 1999](#)). Cette interaction cholestérol-GSL permet au cholestérol hydrophobe de réduire son exposition au solvant aqueux et permet au GSL de stabiliser son céramide dans la membrane plasmique par des interactions entre les acides gras insaturés et les cycles aromatiques du cholestérol. Une association entre le GM1-cholestérol et le sphingomyéline-cholestérol a été mise en évidence dans des membranes ([Lozano, Liu et al. 2013](#)). Cette étroite association suggère un rôle important du cholestérol dans la présentation, l'orientation et l'organisation des GSL dans les membranes cellulaires.

Les interactions extracellulaires des GSL sont illustrées par leur rôle de récepteur de certain virus et de plusieurs toxines : virus du HIV, Shiga Toxine et Toxine Cholérique. La protéine gp120 de la membrane virale de forme 1 du HIV est capable de reconnaître spécifiquement le GalCer (et des molécules apparentées) dans les cellules neuronales, intestinales et reproductrices qui ne présentent aucun récepteur CD4 ([Yahi, Baghdiguian et al. 1992](#)). Les Shiga Toxines 1 et 2 d'origine bactérienne entraînent des complications gastro-intestinales et rénales importantes et ont une spécificité et une affinité très importante pour le Gb3, puisque ces toxines sont inefficaces sur les souris déficientes en Gb3 synthésases. La Toxine Cholérique est capable de se lier spécifiquement au GM1 pour entrer dans la cellule-cible par pinocytose ; une des rares structures cristallines impliquant un GSL a été rapportée pour cette interaction ([Merritt, Sarfaty et al. 1994](#)). Les GSL jouent donc un rôle direct dans les interactions trans cellules-cellules et cellules-pathogènes.

Les fonctions de la partie lipidique associées à la nature de la sphingosine et/ou de l'acide gras au sein de la membrane lipidique restent particulièrement mystérieuses. La fonction des AG présents sur les céramides (AG-Cer) est analysée par l'inactivation des CerS responsables de la sélection des AG à transférer sur le céramide. La répartition des CerS dans chaque tissu des organes de la souris a été décrite et dévoile les spécificités des AG-Cer pour chaque organe (cf. Figure 11) ([Mullen, Hannun et al. 2012](#)). Les CerS2, CerS5 et CerS6 (C16-

Cer ; C24-Cer) sont majoritairement réparties dans l'ensemble des organes sauf dans le cerveau et les muscles squelettiques où le CerS1 et CerS4 (C18-Cer) est majoritaire, et dans l'épiderme et les testicules où le CerS3 est majoritaire (C26-36-Cer). La CerS3 est la seule enzyme impliquée dans la synthèse de céramide à AG long (C26-C36) qui agit uniquement dans l'épiderme et les testicules ([Sandhoff 2010](#)). Il a été montré que le KO de CerS3 chez la souris entraîne une disparition des C26-36-Cer et une rupture fatale de la barrière dermique qui assure une fonction importante dans la rétention d'eau et la protection vis-à-vis des agents pathogènes. La mutation sur la CerS2 dans la souris a montré dans les poumons une diminution significative de l'abondance relative du C24-Cer de 65% et une augmentation significative de l'abondance du C16-Cer de 63% ([Petrache, Kamocki et al. 2013](#)). Cette nouvelle distribution en AG induit une inflammation des voies respiratoires, une obstruction de la circulation de l'air et un accroissement du volume pulmonaire. Une inactivation de CerS1 induit une diminution de C18-Cer dans le cerveau et une augmentation de C16-Cer qui entraîne une dégénérescence des cellules de Purkinje et une ataxie cérébrale. Cette diminution de C18-Cer est également associée à un risque cancérogène plus important dans le cerveau puisque la surexpression de C18-Cer entraîne l'inhibition de la prolifération cellulaire et un effet pro apoptotique. Ensemble ces données suggèrent une fonction propre de l'acide gras présent dans le céramide des sphingolipides.

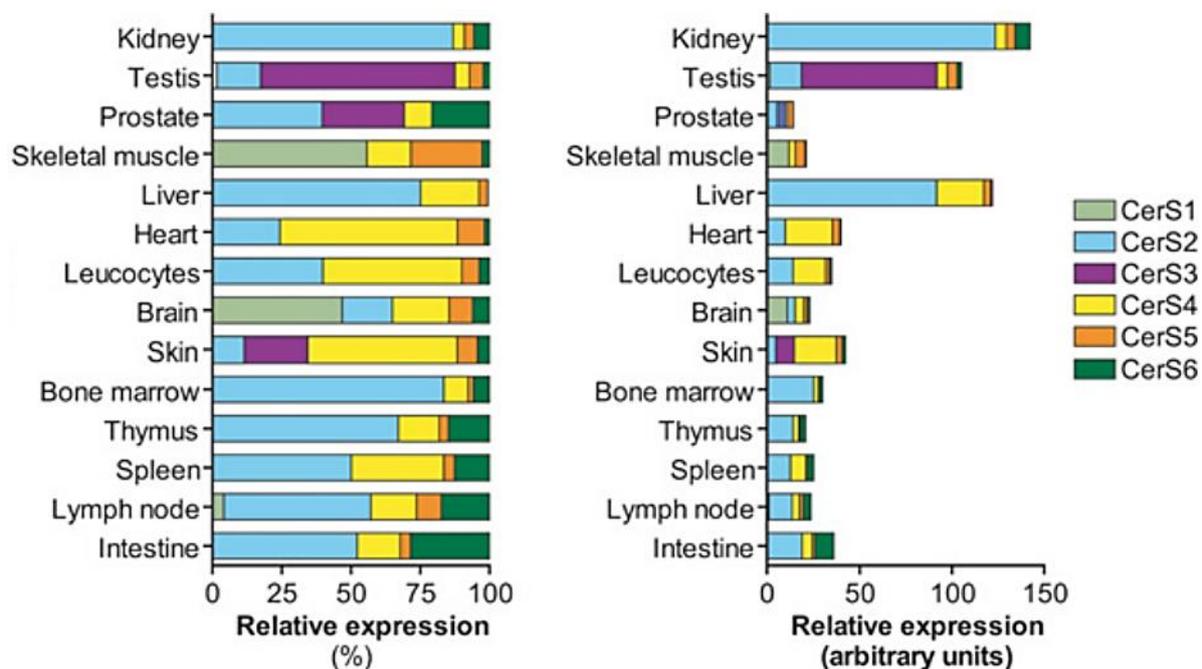


Figure 11 : Expression relative et absolue de la Céramide Synthase dans les organes de souris.
Tiré de ([Mullen, Hannun et al. 2012](#)).

Les analyses structurales des sphingolipides et le profil d'expression des CerS chez la souris nous permettent d'appréhender la complexité et la fonction de cette classe de molécules au sein des organes de ce modèle de vertébré. Mais, les mécanismes d'activation,

de régulation et d'action de ces fonctions restent encore incertains et nécessiteront de nombreuses analyses complémentaires. Cependant, l'analyse des CerS permet déjà d'envisager la localisation et la fonction générale des AG-Cer et donne un regain d'intérêt autant fondamental que thérapeutique, pour la lipidomique. De plus, de nombreuses questions sur la partie sphingosine restent encore en suspens et nécessitent des analyses fonctionnelles approfondies.

Chapitre 5 : Les maladies congénitales de la glycosylation

5.1 Introduction :

Les maladies congénitales de la glycosylation (CDG) sont produites par une mutation autosomale récessive et impliquent les gènes de la biosynthèse des structures glycaniques. Il est estimé que 250 gènes humains seraient impliqués dans les processus de glycosylation des cellules eucaryotes ([Goreta, Dabelic et al. 2012](#)). Ces 250 gènes représentent des cibles potentielles pour les CDG qui peuvent être spécifiques d'une voie de biosynthèse (Ng, Og, GSL, GAG) ou bien être multi-systémiques en impliquant des mutations sur les protéines du trafic intracellulaire, des enzymes de formation des nucléotide-sucres. Depuis la découverte en 1980 des CDG par Jaeken et al. ([Jaeken J 1980](#)), le nombre de CDG identifiées n'a cessé d'augmenter pour s'établir aujourd'hui à plus de 60. Le diagnostic des CDG ([Goreta, Dabelic et al. 2012](#)) a initialement été effectué grâce à l'Iso-Electro-Focalisation de la Transferrine (TIEF) sérique qui permet d'établir le profil de sialylation de la protéine sur plusieurs bandes (0-6) correspondant au nombre d'acides sialiques sur la protéine. Cette technique a permis de classer les CDG en deux groupes : les CDG-I (profile pathologique TIEF-1) exprimant une augmentation des bandes 0 et 2 ([Jaeken, van Eijk et al. 1984](#)) par rapport à un individu sain et les CDG-II (profile pathologique TIEF-2) exprimant aussi une augmentation des bandes 0 et 2 mais également des bandes 1 et 3 ([Ramaekers, Stibler et al. 1991](#)) par rapport à un individu sain. D'une manière générale, les CDG-I correspondent à des mutations de gènes d'initiation de la biosynthèse des Ng au niveau du cycle des dolichols phosphate du RE (*cf.* Figure 6) induisant une absence ou une sous glycosylation des protéines et les CDG-II correspondent à des mutations touchant la maturation (sialylation, fucosylation, antenne) des structures glycaniques au niveau du RE et du Golgi. Cette nomenclature (CDG-I et CDG-II) est en train de disparaître progressivement, puisqu'elle ne s'appuie que sur les profils pathologiques TIEF-1 et TIEF-2 qui ne reflètent que les CDG impliquant les Ng et ne tient pas compte des autres types de glycosylation. Effectivement, des mutations de la glycosylation touchant les GSL ont des profils TIEF normaux et ne peuvent appartenir aux groupes CDG-I ou CDG-II. Une nouvelle nomenclature a été proposée ([Jaeken, Hennet et al. 2009](#)) pour inclure toutes les configurations possibles en associant le gène incriminé au mot CDG comme dans l'exemple suivant : PMM2-CDG (CDG-Ia). Une revue de Jaeken publiée en décembre 2010 ([Jaeken 2010](#)) décrit quarante-cinq CDG caractérisées en terme de fréquences (nombre de patients) et de symptômes. Ces quarante-cinq CDG sont réparties en 4 groupes en fonction des voies de biosynthèses affectées : seize impliquent uniquement les N-glycannes (14 CDG-I et 2 CDG-II), dix impliquent uniquement les O-glycannes, trois impliquent uniquement les glycolipides et seize sont multi-systémiques ou touchent d'autres glycosylations.

5.2 Les CDG multi-systémiques :

Les conséquences des CDG sont plus graves (retard mental, malformation et létalité) lorsqu'elles sont multi-systémiques ou lorsqu'elles impliquent l'initiation de la glycosylation. La PMM2-CDG (CDG-Ia) et la MPI-CDG (CDG-Ib) sont des exemples de CDG multi-systémiques, puisqu'elles inhibent le métabolisme du GDP-Man, et affectent la *N*-glycosylation et la *O*-mannosylation chez les vertébrés. La *phosphomannose isomerase* (MPI) est responsable de la transformation du Fructose-6-Phosphate (Fru-6P) en Mannose-6-Phosphate (Man-6P) alors que la phosphomannomutase 2 (PMM2) est responsable de la transformation du Man-6P en Man-1P servant à former le GDP-Man utilisé dans le cycle des dolichols phosphate. La MPI-CDG induit les symptômes suivants : retard psychomoteur, l'épilepsie, strabisme, l'ataxie, déficience visuelle, hépatomégalie, hypotonie et coagulopathie. La PMM2-CDG représente plus de 80% ([Cylwik, Naklicki et al. 2013](#)) des patients CDG-I identifiés et provoque les symptômes suivants : problèmes neurologiques modérés, vomissements, une entéropathie exsudative, thromboses récurrentes, hépatites, hypoglycémie. Les CDG sont actuellement presque toutes incurables, à quelques rares exceptions dont MPI-CDG et PMM2-CDG (modèle murin uniquement) font parties ([Thiel and Korner 2013](#)). Les mutations PMM2-CDG et MPI-CDG sont létales à court terme sans un traitement par un apport en mannose, qui permet de réduire considérablement leurs symptômes. Un modèle expérimental murin de cure par un apport pré- et post-natal de mannose est actuellement développé pour les PMM2-CDG ([Schneider, Thiel et al. 2012](#)) et apporte d'intéressantes améliorations sur le profil TIEF, sur la formation des organes et le pronostic vital. Cependant, les tests thérapeutiques humains sur un seul patient PMM2-CDG âgé d'un an, par un apport post-natal tardif en mannose par transfusion continue durant 6 semaines, n'ont pas permis d'améliorer significativement les symptômes les plus graves ([Mayatepek, Schroder et al. 1997](#); [Mayatepek and Kohlmuller 1998](#)). Les CDG illustrent donc parfaitement le rôle fondamental des glycanes dans l'organisation et le développement des êtres vivants et nous permettent d'analyser les conséquences de leurs perturbations métaboliques.

De nouvelles CDG-II multi-systémiques impliquées dans le transport vésiculaire rétrograde du Golgi ont été découvertes récemment et impliquent des mutations du Complexe Oligomérique Golgien (COG). Le COG est composé de huit sous-unités protéiques ([Ungar, Oka et al. 2002](#)) qui forment deux lobes distincts : le lobe A (COG1-4) et lobe B (COG5-8). Ces lobes sont retrouvés dans tous les tissus humains ([Quental, Azevedo et al. 2010](#)) et sont reliés par l'interaction des sous-unités COG1 et COG8 ([Ungar, Oka et al. 2005](#); [Foulquier, Ungar et al. 2007](#)). Le COG est engagé dans le trafic rétrograde en favorisant l'attachement et la fusion de vésicules COPI avec les saccules golgiennes par de multiples interactions avec les protéines Rab (Ypt1p/Rab1, Rab30), plusieurs protéines SNAREs, les protéines SM (Sec1/Munc18-like) Sly1 et les protéines du manteau COPI ([Willett, Ungar et al. 2013](#)). Le transport rétrograde permet d'assurer la localisation spécifique des GT membranaires et des transporteurs de nucléotides-sucre dans les saccules golgiennes

([Rosnoblet, Peanne et al. 2013](#)). Le transport rétrograde assure également l'intégrité et la stabilité des saccules golgiennes en rapportant les membranes déplacées par le transport antérograde ou la maturation des saccules golgiennes. Plusieurs CDG-II concernant des mutations sur les monomères du COG ont été rapportées sur les COG1 ([Foulquier, Vasile et al. 2006](#)), COG4 ([Reynders, Foulquier et al. 2009](#)), COG5 ([Paesold-Burda, Maag et al. 2009](#)), COG6 ([Lubbehusen, Thiel et al. 2010](#)), COG7 ([Wu, Steet et al. 2004](#)) et COG8 ([Foulquier, Ungar et al. 2007](#)). Toutes ces COG-CDG peuvent induire les symptômes suivant ([Wells, Hettiarachchi et al. 2003](#)): malformations, microcéphalie, retard de croissance, complications hépatiques, problèmes neurologiques, des retards psychomoteurs.

Enfin, une catégorie de protéines impliquées dans la régulation du pH golgien, qui varie négativement de 0,5 point du cis-Golgi au TGN, seraient incriminées dans de nouvelles CDG-II. La protéine ATP6VOA2 est une ATPase vacuolaire responsable de l'acidification de plusieurs compartiments cellulaires ([Finbow and Harrison 1997](#)) dont le Golgi. La carence de la protéine ATP6VOA2 dans la maladie de Cutis Laxa cause des problèmes de glycosylation des protéines ([Morava, Wopereis et al. 2005](#)). Un autre exemple de l'implication de la régulation du pH Golgi pourrait provenir de la protéine TMEM165 dont quatre mutations identifiées provoquent une CDG-II chez cinq patients identifiés. Le rôle de TMEM165 n'est pas connu mais plusieurs indices suggèrent un rôle de transporteur de protons ([Foulquier, Amyere et al. 2012](#)).

5.3 Les CDG spécifiques d'un type de glycosylation :

Les CDG-I se trouvent principalement au niveau du cycle des dolichols phosphates du RE (*cf.* Figure 6). Prenons les exemples de deux CDG qui impliquent exclusivement la voie des Ng : la ALG11-CDG (CDG-Ip) qui code pour une α -1,2-mannosyltransferase du RE et de la Man1B1-CDG qui code pour une α -1,2-mannosidase du RE. La ALG11-CDG Humaine ([Rind, Schmeiser et al. 2010](#)) induit une accumulation des $\text{Man}_{3-4}\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dolichol}$ et un profil TIEF typique des CDG-I. Cette mutation provoque les symptômes suivants : une hypotonie musculaire, des convulsions, un retard du développement et une mort précoce vers l'âge de 2 ans. La Man1B1-CDG est responsable de la réduction dans le RE du $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ en $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ des Ng au niveau du cycle CNX/CRT afin de permettre aux protéines bien conformées d'être dirigées vers le Golgi et aux protéines mal conformées d'être dirigées vers la voie ERAD ([Gauss, Kanehara et al. 2011](#)). Cette mutation affecte donc l'orientation des glycoprotéines et leurs éliminations par la voie ERAD. Les patients MAN1B1-CDG développent un retard mental et des malformations ([Rafiq, Kuss et al. 2011](#)).

Les CDG-II se trouvent principalement au niveau du Golgi et impliquent la glycosylation terminale par des mutations sur les glycosyltransférases, sur les transporteurs ou sur les protéines du transport vésiculaire. Les MGAT2-CDG (CDG-IIa) et GCS1-CDG (CDG-IIb) sont les mieux décrites et correspondent respectivement à des mutations sur une

glycosyltransférase (β -1,2-GlcNAcT-II) et une glycosidase (α -1,2-glucosidase-I). La MGAT2-CDG implique une mutation de la β -1,2-GlcNAcT-II du cis-Golgi qui transfère une unité de GlcNAc sur le mannose en α 1-6 du $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_3\text{-R}$ pour former la base de la seconde antenne des Ng. La MGAT2-CDG induit une accumulation de Ng mono-sialylés à une seule antenne ([Jaeken, Schachter et al. 1994](#)). La GCS1-CDG implique le gène *CCS1* qui code pour l' α -1,2-glucosidase-I responsable de la réduction de la structure $\text{Glc}_3\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2\text{-R}$ dans le RE ; cette mutation produit une accumulation d'oligomannoses et une réduction des types complexes et hybrides. La GCS1-CDG produit également des quantités importantes d'oligosaccharides libres de type Glc_3Man_1 qui peuvent être détectés dans les urines ([De Praeter, Gerwig et al. 2000](#)) de ces patients.

Les CDG impliquant uniquement la biosynthèse des *O*-glycannes ([Wopereis, Lefeber et al. 2006](#); [Hennet 2012](#)) affectent la *O*-GalNAcylation (3 gènes), la *O*-Mannosylation (6 gènes) et la *O*-Fucosylation (2 gènes). Les CDG des Og de type mucine impliquent une mutation sur les gènes *ppGAINAc-T3* (GALNT3-CDG), *ppGAINAc-T12* (GALNT12-CDG) et le gène *COSMC* qui code pour une protéine chaperonne indispensable à l'activité de la β 1-3Gal-T ([Ju and Cummings 2002](#)) nécessaire à la formation du noyau 1 des Og. La redondance des formes des ppGAINAc-T rend incertaine la prévision des symptômes cliniques de la mutation d'une des ppGalNTx. La GalNT3-CDG induit des symptômes similaires à la maladie de la calcinose tumorale puisque ces maladies sont provoquées par l'inactivation de la protéine FGF23 ([Chafetz and Sprecher 2009](#)) (Fibroblaste facteur 23) qui régule le métabolisme du calcium et du phosphate. Dans le cas de la GalNT3-CDG, la protéine FGF23 ne présente plus de Og sur son site Thr¹⁷⁸, ce qui a pour conséquence d'inhiber sa sécrétion, de réduire sa durée de vie (en exposant un site de coupure protéolytique) et de diminuer son activité ([Kato, Jeanneau et al. 2006](#)). La GALNT12-CDG est associée à une augmentation du cancer du côlon qui pourrait être provoqué par une diminution de la *O*-GalNAcylation de la protéine MUC1 ([Guda, Moinova et al. 2009](#)). La COSMC-CDG induit le syndrome-Tn ([Ju and Cummings 2005](#)) chez le patient en raison d'une accumulation de structures antigéniques Tn. Cette maladie entraîne des désordres hématologiques légers : une anémie, une diminution des plaquettes et des leucocytes.

Les CDG affectent également spécifiquement les voies de biosynthèse des glycolipides. Aujourd'hui, quatre mutations impliquent la biosynthèse des ancres lipidiques (GPI) alors qu'une seule implique celle des glycosphingolipides. La mutation affectant la biosynthèse des GSL (*cf.* Figure 10) porte sur le gène de la *ST3GAL5* qui est une GM3 synthase (GM3S). La ST3GAL5-CDG est donc responsable de la perte du GM3 et des gangliosides associés (a-séries et b-séries), ainsi que de l'augmentation des précurseurs métaboliques (LacCer). La ST3GAL5-CDG entraîne les symptômes suivants : problèmes psychomoteurs, retard de croissance, hypotonie et cécité ([Simpson, Cross et al. 2004](#)).

PARTIE A

PARTIE A : Analyse structurale des N- et O-glycannes et des Glycosphingolipides du poisson zèbre

Chapitre 1 : Glycobiologie du Poisson Zèbre

A.1.1 Généralité sur le poisson zèbre :

Le poisson zèbre (ZF) est un modèle biologique majeur des vertébrés, qui répond à la classification biologique suivante : [Règne] Animalia, [Embranchement] Chordata, [Sous-Embranchement] Vertebrata, [Classe] Actinoptergii, [Ordre] Cypriniformes, [Famille] Cypridae, [Genre] *Danio*, [Espèce] *D. rerio* (cf. Figure 12). Le ZF est utilisé par les biologistes pour explorer les disciplines de la génétique, l'embryologie, l'immunologie, la cancérologie, la neurologie et la régénérescence. Les intérêts pour ce modèle biologique sont très nombreux puisque son génome est aujourd'hui entièrement séquencé et annoté grâce aux chercheurs du groupe *Wellcome Trust Sanger Institute* (UK) qui avaient lancé ce projet dès 2001. Ces recherches ont permis d'identifier 26206 gènes codant pour des protéines sur un total de 1,41 milliard de paires de base. Le génome humain codant pour des protéines partage 71,4% de gènes homologues avec celui du ZF et 84% de gènes humains impliqués dans une pathologie ont leurs homologues dans le ZF ([Howe, Clark et al. 2013](#); [Kettleborough, Busch-Nentwich et al. 2013](#)). La connaissance génétique du ZF a permis de générer de nombreux mutants disponibles commercialement sur le site du ZIRC (*Zebrafish International Resource Center*), ce qui a facilité la dispersion de ce modèle biologique dans beaucoup de laboratoires. Les analyses phylogénétiques montrent que les Actinoptérygiens auraient dupliqués leur génome entier trois fois alors que les Tétrapodes ne l'auraient dupliqués que 2 fois (cf. Figure 12). La triple multiplication génomique des actinoptérygiens (1xGénome x2 x2 x2) aurait produit un maximum huit copies par gène. Cependant, la perte progressive de copies de gènes et/ou de chromosomes aurait réduit chez les actinoptérygiens le nombre moyen de copies de gènes à 5-7 exemplaires et le nombre de chromosomes à cinquante ([Meyer and Schartl 1999](#)). Bien que le nombre de chromosomes de l'Homme (46) et du poisson zèbre (50) soit relativement proche, il s'avère que le poisson zèbre ait tendance à avoir beaucoup plus de gènes codant que l'Homme. D'une manière générale, ce même constat s'applique entre les actinoptérygiens et les mammifères, les oiseaux, les reptiles et les amphibiens. Cette multiplicité génétique a permis aux actinoptérygiens d'avoir une évolution et une diversité importante dans le groupe des vertébrés qui représentent aujourd'hui plus de 25000 espèces. Cette spécificité génétique a produit un nombre important de pseudo-gènes et de copies de gènes (synténiques ou non) qui a eu pour conséquence de complexifier la régulation de l'expression génique dans ce modèle.

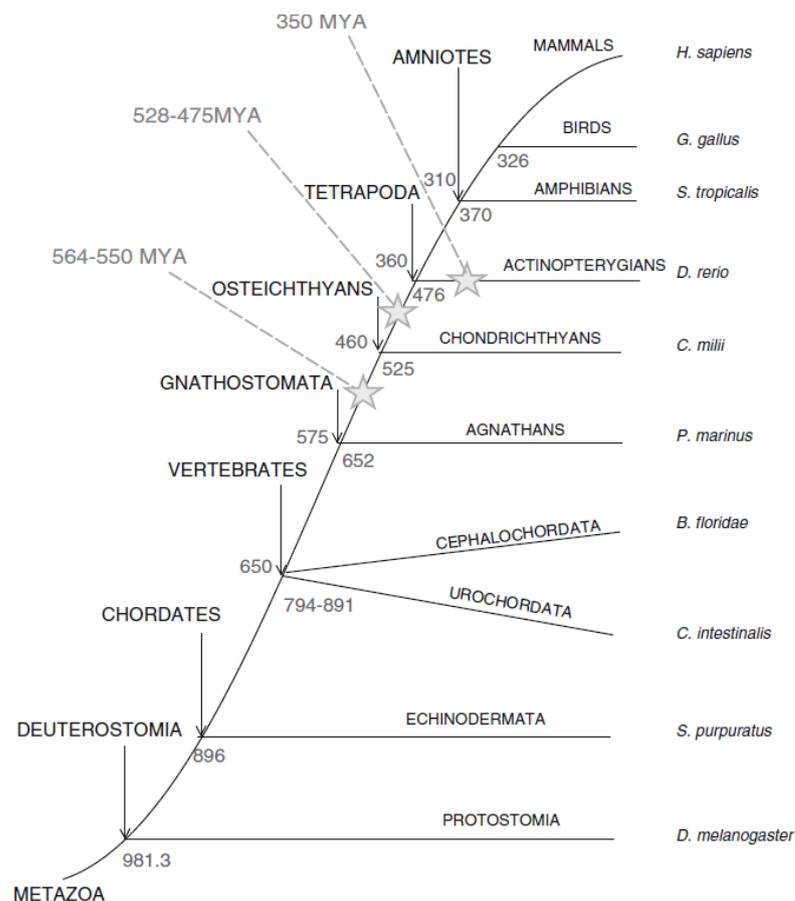


Figure 12 : Illustration de l'arbre de vie de métazoaire.

Les dates supposées en million d'années ; les dates en dessous et au-dessus des branches correspondent respectivement à la séparation des différents phylums et au phénomène de duplication des sialyltransférases. Les étoiles correspondent au phénomène de duplication du génome entier. Tiré de ([Petit, Teppa et al. 2013](#))

Des techniques génétiques de *Knock-Out* transitoire par l'utilisation des ARN interférents (ARNi) ou Morpholino Oligonucléotides (MO) ([Shestopalov and Chen 2010](#)) et les mutations stables par recombinaisons homologues par *Transcription Activator-Like Effector Nuclease* (TALEN) ([Bedell, Wang et al. 2012](#)) et par *Zinc Finger Nucleases* (ZFN) ([Doyon, McCammon et al. 2008](#)) sont couramment utilisées sur le ZF et permettent de moduler efficacement l'expression de son transcriptome. Les ARNi sont des oligo-déoxynucléotides naturels et simples brins d'environ 23 pb qui s'hybrident sélectivement à leur ARNm cible pour l'inactiver grâce à la formation d'un ARNm double brin inhibant la traduction par encombrement stérique du site d'initiation et d'activation du système RISC (*RNA-induced silencing complex*) et/ou de la RNase H qui dégradent les ARNm double brin. Les MO sont des oligo-desoxyanucléotides artificiels simples brins basés sur un squelette morpholine-phosphorodiamidate et ont été largement utilisés dans le poisson zèbre. Les MO utilisent un système d'hybridation similaire au RNAi mais ont généralement plus d'affinité envers leur ARNm cible et ne déclenchent pas le système RISC ou la RNase H. Les MO ont des séquences d'environ 25 pb qui s'hybrident spécifiquement sur leur pré-ARNm ou ARNm

cible, induisant respectivement un défaut d'épissage et des pertes d'exons associés ou une inhibition de l'initiation de la traduction. Les MO sont plus stables et moins cytotoxiques que les RNAi et ont donc été plus utilisés dans le poisson zèbre. La technologie des MO est dose dépendante (50 à 1000 fmol par embryon) et n'est efficace chez le poisson zèbre que durant les 3 à 5 premiers jours de développement, puisque la multiplication cellulaire réduit la concentration intracellulaire des MO. De plus, l'activité et la sélectivité des MO pour leur cible doivent être contrôlées puisque des activités hors-cibles ont déjà été rapportées, celles-ci peuvent être réduites par l'utilisation de plusieurs MO à basse concentration ciblant le même ARNm. Le caractère cytotoxique des MO a été observé par l'augmentation spécifique de l'expression du gène p53 par un mécanisme inconnu, mais peut-être atténué par l'utilisation conjointe de MO anti-p53 qui n'affecte pas l'embryogenèse. Les techniques de TALEN et ZFN permettent de générer des mutations stables dans les cellules somatiques et germinales par *Knock-In* dans le locus de gènes cibles en incorporant une séquence nucléique courte par recombinaison homologue, lors des processus de réparation de l'ADN double brin. La technologie ZFN permet également de réaliser des mutagenèses dirigées ou de dénaturer le gène par suppression de nucléotides.

En plus, de ces connaissances génétiques approfondies, le ZF possède de nombreux avantages que d'autres modèles de vertébrés n'ont pas. En effet, le ZF produit de nombreux embryons fécondés et transparents qui se développent hors du corps de la femelle et qui sont faciles à utiliser pour des expériences de biologie moléculaire ou de localisation par microscopie à fluorescence. L'élevage et le croisement de poissons zèbres sont facilités par un temps de génération rapide et un coût d'entretien et d'élevage relativement faible. Ces avantages techniques, scientifiques et économiques ont permis au poisson zèbre d'être l'un des modèles biologiques de vertébrés les plus utilisés par la communauté scientifique et représente aujourd'hui plus de 10000 publications sur Pubmed. Il a été utilisé lors de nombreuses analyses de régulation génique de surexpression, sous-expression ou complémentation, qui ont permis d'étudier le rôle de certaines protéines-clés impliquées dans les étapes de développement par mécanismes de différenciation cellulaire, d'organogenèse et de mise en place des axes du développement corporel ([Talbot, Trevarrow et al. 1995](#); [Gritsman, Zhang et al. 1999](#); [Ober, Verkade et al. 2006](#)). Le poisson zèbre s'illustre aussi comme un excellent modèle d'étude physiopathologique de diabète ([Rubinstein 2003](#)), cancer ([Feitsma and Cuppen 2008](#); [Liu and Leach 2011](#)), dystrophie musculaire ([Berger and Currie 2012](#)), maladies cardiovasculaires ([Chico, Ingham et al. 2008](#)), poly-cystique rénale ([Drummond 2005](#)), maladies neuro-dégénératives ([Bai and Burton 2011](#)), CDG ([Cline, Gao et al. 2012](#); [Chu, Mir et al. 2013](#)). Il est maintenant admis que le poisson zèbre adulte est capable de régénérer plusieurs de ses organes ou tissus dont les muscles, le cœur, le pancréas, le foie, la peau, les cellules pigmentaires, les nageoires, les barbillons et le système nerveux central ([Kizil, Kaslin et al. 2012](#)). Ce modèle biologique possède toutes les qualités requises pour devenir une excellente plateforme d'études génétiques, structurales et fonctionnelles de la glycobiologie. Cependant, d'une manière surprenante, nous constatons un véritable manque de données structurales sur

l'organisation des oligosaccharides du poisson zèbre, qui entrave lourdement l'évolution de ce modèle vers la glycobiologie.

A.1.2 Glycobiologie du poisson zèbre :

Les études sur la glycobiologie du ZF sont encore relativement restreintes, mais commencent à prendre un essor considérable grâce notamment aux études de biologie structurale, à l'émergence de mutants spécifiques de voies métaboliques de glycosylation et aux nouvelles techniques de marquage glycanique sur ce modèle ([Flanagan-Steet and Steet 2013](#)). L'analyse structurale des glycoaminoglycannes (GAG) et des glycoconjugués (Ng et Og principalement) aux différents stades embryonnaires ont permis de cibler plusieurs enzymes-clés en glycobiologie et d'analyser l'impact de leurs mutations sur le développement. Plusieurs sialyltransférases et fucosyltransférases ont été identifiées et caractérisées dans le poisson zèbre et le niveau d'expression de leurs ARNm a aussi été analysé dans plusieurs organes. Un autre aspect de la glycobiologie du ZF est son orientation récente vers un modèle d'étude pathologique des CDG. Ce modèle biologique permet l'étude de la glycobiologie dans des cas très précis, comme l'impact de la chitine ou de la O-mannosylation sur le développement du ZF. Enfin, le ZF a été utilisé pour analyser l'évolution de la glycosylation au cours du développement par un marquage métabolique spécifique de monosaccharides. Dans ce chapitre, nous détaillerons les connaissances actuelles de la glycobiologie du ZF, afin de préciser les atouts de ce modèle en glycobiologie.

Notre équipe en collaboration avec celle du Dr Khoo a analysé les glycoconjugués du ZF au cours du développement embryonnaire par spectrométrie de masse (MS) et par résonance magnétique nucléaire (RMN) ([Guerardel, Chang et al. 2006](#); [Chang, Harduin-Lepers et al. 2009](#)). Ces études ont mis en évidence l'évolution des structures glycaniques et en particulier de la sialylation au cours du développement embryonnaire du ZF entre 0-48 *hour post fertilization* (hpf). Les Ng sont principalement composées de structures oligomannosylés $\text{Man}_{5-9}\text{GlcNAc}_2$ et de structures complexes (bi-antennées) suivantes : $\text{Neu5Ac}_2\text{Fuc}_2\text{Hex}_7\text{HexNAc}_4$ (3551 Da) et $\text{Neu5Gc}_2\text{Fuc}_2\text{Hex}_7\text{HexNAc}_4$ (3611 Da). Les antennes majoritaires des Ng complexes des embryons ont une séquence glycanique de $\text{Gal}\beta 1-4(\text{Neu5Ac}/\text{Gca}\alpha 2-3)\text{Gal}\beta 1-4(\text{Fuca}\alpha 1-3)\text{GlcNAc-R}$; cette structure est un sialyl-Lewis X substitué par un galactose en $\beta 1-4$ en position terminale. Les Og des embryons du ZF sont constitués de noyaux 1 et 2, qui présentent les structures suivantes : $\text{Fuca}\alpha 1-3\text{GalNAc}\beta 1-4(\text{Neu5Ac}/\text{Gca}\alpha 2-3)\text{Gal}\beta 1-3\text{GalNAc-itol}$ (noyau 1), $\text{Fuca}\alpha 1-3\text{GalNAc}\beta 1-4([\text{Neu5Ac}/\text{Gca}\alpha 2-8]\text{Neu5Ac}/\text{Gca}\alpha 2-3)\text{Gal}\beta 1-3\text{GalNAc-itol}$ (noyau 1) et $\text{Neu5Ac}\alpha 2-3\text{Gal}\beta 1-3[\text{Neu5Ac}\alpha 2-3\text{Gal}\beta 1-4(\text{Fuca}\alpha 1-3)\text{GlcNAc}\beta 1-6]\text{GalNAc-itol}$ (noyau 2). Les Ng et Og présentent des structures sialylées entre 0-24 hpf, qui évoluent au cours du développement du ZF. Les analyses sur la quantité et le degré de polymérisation de l'acide sialique montrent une diminution significative et progressive de ces deux paramètres dans les glycoprotéines embryonnaires

du ZF aux temps 0, 8, 24 et 48 hpf. A l'inverse, la quantité et le degré de polymérisation de l'acide sialique augmente significativement et progressivement dans les glycosphingolipides embryonnaires aux temps 0, 8, 24 et 48 hpf. La réorganisation complète de la sialylation au cours du développement des embryons du ZF pourrait être imputée aux nombreuses sialo-protéines maternelles et aux sialidases présentes dans l'espace péri-vitellin des embryons. Le relargage d'acide sialique libre dans cet espace pourrait servir de source exogène d'acide sialique d'origine maternelle pour le développement embryonnaire et la sialylation des GSL. Ensemble, ces données définissent la première base de glycobiologie structurale pour le développement du ZF.

Les études de la glycobiologie du ZF illustrent l'importance des GAG au cours du développement embryonnaire du ZF, notamment par la mutation ou l'inhibition de leurs voies de biosynthèse. L'UDP-Xyl initie la biosynthèse de chondroïtanes et d'héparanes qui sont nécessaires à la formation du squelette cranio-facial du ZF ([Eames, Singer et al. 2010](#)). L'UDP-Glc déshydrogénase produit l'UDP-GlcUA nécessaire à la formation des chondroïtanes, des héparanes et des acides hyaluroniques. L'activité de l'UDP-Glc déshydrogénase est nécessaire à la formation de valves cardiaques normales puisque son dysfonctionnement entraîne l'apparition du syndrome de Jerkyl ([Walsh and Stainier 2001](#)).

Des études basées sur la biologie moléculaire et la phylogénie ont montré les niveaux d'expressions et les rôles spécifiques des α 2-8sialyltransférases dans le cerveau du poisson zèbre ([Chang, Mir et al. 2009](#)) et au niveau de la mise en place du myotome ([Bentrop, Marx et al. 2008](#)). Une seconde étude analyse l'évolution des α 2-8sialyltransférases chez les deutérostomes expliquant leur incroyable diversité ([Harduin-Lepers, Petit et al. 2008](#)). L'expression des α 2-8sialyltransférases (ST8Sia-II ou ST8Sia-IV) est indispensable à la formation des *Neural Cell Adhesion Molecule* (NCAM) et permet l'extension et la fasciculation des axones du ZF ([Langhauser, Ustinova et al. 2012](#)). Une sialyltransférase nommée zST3GalV-2 a également été caractérisée et serait responsable de la synthèse de gangliosides de type GM4 dans l'intestin du poisson zèbre, alors que la zST3GalV-1 ne synthétiserait que du GM3 dans le cerveau du poisson zèbre ([Chisada, Yoshimura et al. 2009](#)). Les enzymes zFT1 et zFT2 (α 1,3-fucosyltransférases) ont été clonées dans des cellules de mammifères et caractérisées *in vitro*. Il s'avère que celles-ci sont différemment exprimées ; zFT1 est exprimée uniquement avant éclosion, alors que zFT2 est exprimée uniquement après éclosion ([Kageyama, Natsuka et al. 1999](#)). La fucosyl-transférase zFT1 est capable de synthétiser le Le^X durant la segmentation embryonnaire du poisson zèbre qui génère, suite à l'action des endo- β -N-acetylglucosaminidase embryonnaires, l'apparition d'oligosaccharides libres portant du Le^X ([Moriguchi, Takemoto et al. 2007](#)).

Le poisson zèbre révèle également son utilité dans l'étude des CDG ([Cline, Gao et al. 2012](#); [Chu, Mir et al. 2013](#)) puisque l'utilisation de MO ciblant les gènes *PMM2* et *MPI* dans la cellule embryonnaire du ZF au stade 0 hpf a montré respectivement des phénotypes similaires aux *PMM2*-CDG et *MPI*-CDG humaines. En effet, Les morphants *PMM2* du ZF

exhibent les symptômes suivants : déformation cranio-faciale, perte de mobilité, diminution des niveaux de Ng et de LLO, accumulation de Man-6P. De plus, ces morphants permettent d'analyser précisément les défauts embryonnaires du développement du ZF en « temps réel » et permettent de tester directement les thérapies par apport de mannose pré- et post-éclosion. Il apparaît que seul un traitement par le mannose avant 24 hpf a une incidence significative sur les symptômes de la MPI-CDG. La transparence optique est un véritable atout pour l'analyse en microscopie de fluorescence de l'effet des CDG sur le développement du ZF.

L'expression transitoire de la chitine synthétase au niveau de la midblastula a été découverte dans le poisson zèbre et induit la présence de chitine embryonnaire lors de la fin de la gastrulation. La chitine joue un rôle indispensable au niveau du développement embryonnaire, puisque l'utilisation d'inhibiteur de la chitine synthétase ou l'utilisation de chitinase au stade une cellule entraîne des déformations importantes du thorax et de la queue (65 %) à 48 hpf ([Bakkers, Semino et al. 1997](#)). Il a également été montré dans le poisson zèbre que la O-mannosylation qui est une forme de glycosylation minoritaire des protéines est indispensable au développement embryonnaire normal ([Avsar-Ban, Ishikawa et al. 2010](#)).

Récemment, le poisson zèbre a fait l'objet de plusieurs études sur le marquage métabolique ([Laughlin, Baskin et al. 2008](#); [Laughlin and Bertozzi 2009](#); [Baskin, Dehnert et al. 2010](#); [Dehnert, Beahm et al. 2011](#); [Jiang, Feng et al. 2011](#); [Zheng, Jiang et al. 2011](#); [Dehnert, Baskin et al. 2012](#); [Li, Mock et al. 2012](#)) par des analogues glycaniques azidés grâce aux techniques de *click-chemistry* de *Strain Promoted Azide-Alkyne cycloaddition* (SPAAC) en utilisant principalement du DIFO couplé à de l'Alexa-fluor. En 2008, le groupe du Pr Bertozzi a incorporé de l'Ac4-GalNAz entre 3 et 60 hpf et visualisé ce mime de sucre dans la mâchoire et les zones olfactives du poisson zèbre par un triple marquage aux DIFO-488, DIFO-555 et DIFO-647 à 60, 61 et 62 hpf respectivement ([Laughlin, Baskin et al. 2008](#)). Cette même équipe publie en 2009 des travaux similaires sur le marquage *in vivo* de la glycosylation du poisson zèbre avec l'utilisation de plusieurs de l'Ac4-GlcNAz et Ac4-ManNAc ([Laughlin and Bertozzi 2009](#)), ainsi que la possibilité d'utiliser la liaison de Staudinger pour lier des phosphines fluorescentes. En 2010, ils publient des travaux sur l'incorporation de mimes de GalNAc dans les stades précoces de développement du poisson zèbre à 7 hpf et montrent une réorganisation totale de la répartition des glycannes au cours de la mitose cellulaire ([Baskin, Dehnert et al. 2010](#)). Ensuite, cette équipe a réussi à visualiser *in vivo* un analogue fonctionnel du fucose dans les 5 premiers jours de développement du poisson zèbre par SPAAC en utilisant directement le GDP-FucAz, puisque le FucAz-1P qui est modifié en C6 n'est pas reconnu par la fucose-1-phosphate guanyltransferase (FPGT) qui catalyse la transformation du Fuc-1P en GDP-Fuc ([Dehnert, Beahm et al. 2011](#)). L'équipe du Pr Wu a réalisé en 2012 un marquage chimio-enzymatique des LacNAc néo-synthétisés présents dans les glycoconjugués en incubant les cellules avec du GDP-FucAl et une $\alpha(1,3)$ fucosyltransferase qui reconnaît spécifiquement le motif LacNAc et produit du Le^x et

peut utiliser le GDP-FucAl. Ces travaux ont montré une répartition spécifique du LacNAc dans plusieurs types de cellules et dans l'embryon du poisson zèbre ([Zheng, Jiang et al. 2011](#)).

A.1.3 Nos Objectifs :

Nos objectifs sont de développer le modèle biologique de vertébré du ZF vers le domaine de la glycobiochimie structurale, en focalisant notre attention sur les glycoconjugués (GSL, Ng et Og). Nous avons travaillé sur trois niveaux d'organisation distincts du ZF: une lignée cellulaire d'hépatocytes (ZFL), les embryons et les organes du ZF adulte. Ces études structurales complètes serviront à définir une base structurale solide de glycobiochimie pour le ZF et permettront l'émergence de nouvelles études sur les relations structures-fonctions. En alliant les connaissances structurales avec celles du développement et de la génétique qui sont les grands atouts du ZF, ces études permettront de créer une plateforme d'étude de la glycosylation des vertébrés. En outre, les variations structurales des glycanes du ZF adulte nous permettront de définir des spécificités glycaniques de chaque organe. Ces résultats permettront d'appréhender l'évolution des structures glycaniques au sein des vertébrés, en comparant les structures glycaniques du ZF avec celles déjà décrites des modèles humains et murins. Enfin, ces travaux s'inscrivent dans une optique de recherche fondamentale et vise à étendre nos connaissances de la glycobiochimie structurale marine sur un modèle majeur de vertébré.

Chapitre 2 : La lignée cellulaire ZFL

A.2.1 Introduction :

La lignée cellulaire *Zebra Fish Liver* (ZFL) est dérivée directement à partir de 10 foies de ZF adultes (*Brachydanio rerio*) et supporte une croissance en culture au-delà de cent générations. Les cellules ZFL sont hypodiploïdes (47 chromosomes) et présentent une morphologie exclusivement épithéliale en culture ([Ghosh, Zhou et al. 1994](#)). Cette lignée cellulaire a été utilisée dans des études de toxicologie ([Zhu and Chan 2012](#); [Teng, Ekman et al. 2013](#)), de pharmacologie ([He, Krens et al. 2011](#)) et de régulation post-transcriptionnelle ([Kanter, Sun et al. 2011](#)). Nous avons réalisé une analyse de glycobiologie sur ce modèle cellulaire pour découvrir l'organisation des glycanes du foie de poisson zèbre.

Nous avons commencé par l'analyse structurale des glycoconjugués de la lignée cellulaire ZFL pour mettre au point nos techniques de purifications et d'analyses des glycoconjugués (GSL, Ng et Og) par des techniques spectroscopiques (MS, MS/MS et RMN) et enzymatiques. Puis, nous avons réalisé des analyses de biologies moléculaires sur les fucosyltransférases (FT) et les sialyltransférases (ST) pour connaître le niveau d'expression de ces GT dans la lignée ZFL. L'analyse structurale et génétique a ensuite été comparée pour corrélérer les résultats obtenus entre les structures découvertes et les enzymes exprimées. Enfin, nous avons utilisé la lignée cellulaire ZFL pour réaliser des tests sur le traçage et d'incorporation de l'acide sialique par des techniques fluorescentes de microscopie et de quantification par HPLC. Ainsi, cette étude de glycobiologie de la lignée cellulaire ZFL fait office d'une première approche de la glycosylation hépatique du poisson zèbre.

A.2.2 Publication :

Mapping the Expressed Glycome and Glycosyltransferases of Zebrafish Liver Cells as a Relevant Model System for Glycosylation Studies

Jorick Vanbeselaere,^{†,‡,§} Lan-Yi Chang,^{§,||} Anne Harduin-Lepers,^{†,‡} Emeline Fabre,^{†,‡} Nao Yamakawa,^{†,‡} Christian Slomianny,[⊥] Christophe Biot,^{†,‡} Kay-Hooi Khoo,^{||} and Yann Guerardel^{†,‡,*}

[†]Université Lille Nord de France, Université Lille 1, Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UGSF, F-59650 Villeneuve d'Ascq, France

[‡]CNRS, UMR 8576, F-59650 Villeneuve d'Ascq, France

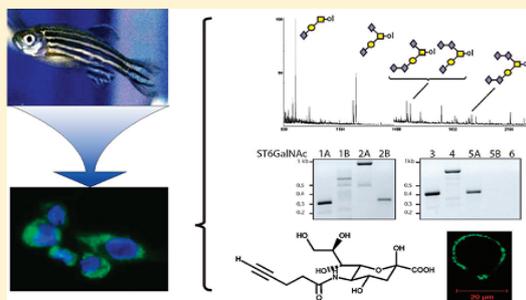
^{||}Institute of Biological Chemistry, Academia Sinica, Taipei 115, Taiwan

[⊥]INSERM-LPC, U1003, Université Lille 1, Cité Scientifique, Bât. SN3, F-59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

Supporting Information

ABSTRACT: The emergence of zebrafish as a model organism for human diseases was accompanied by the development of cellular model systems that extended the possibilities for *in vitro* manipulation and *in vivo* studies after cell implantation. The exploitation of zebrafish cell systems is, however, still hampered by the lack of genomic and biochemical data. Here, we lay a path toward the efficient use of ZFL, a zebrafish liver-derived cell system, as a platform for studying glycosylation. To achieve this, we established the glycomic profile of ZFL by a combination of mass spectrometry and NMR. We demonstrated that glycoproteins were substituted by highly sialylated multiantennary *N*-glycans, some of them comprising the unusual zebrafish epitope Gal β 1–4[Neu5Ac(α 2,3)]Gal β 1–4[Fuc(α 1,3)]GlcNAc, and core 1 multisialylated *O*-glycans. Similarly, these analyses established that glycolipids were dominated by sialylated gangliosides. In parallel, analyzing the expression patterns of all putative sialyl- and fucosyltransferases, we directly correlated the identified structures to the set of enzymes involved in ZFL glycome. Finally, we demonstrated that this cell system was amenable to metabolic labeling using functionalized monosaccharides that permit *in vivo* imaging of glycosylation processes. Altogether, glycomics, genomics, and functional studies established ZFL as a relevant cellular model for the study of glycosylation.

KEYWORDS: zebrafish, cell culture, glycomics, structure, glycosyltransferases, metabolic labeling



INTRODUCTION

The zebrafish *Danio rerio* has emerged in recent years as an excellent model to study the genetic basis of vertebrate development. The availability of thousands of mutant variants allows *in vivo* dissection of developmental processes at single cell and molecular resolution. It exhibits many experimental advantages including a very short generation time, which enables fast generation of transgenic lines. Its embryos are optically transparent, develop externally and can absorb mutagens directly from surrounding water. The popularity of this model system resulted in the rapid accumulation of a large body of genetic data providing the unique opportunity to follow the functional involvement of glycoconjugates in a vertebrate model throughout its complete embryogenesis. Indeed, numerous recent studies in zebrafish reported direct involvement of glycoconjugates into a vast array of fundamental biological processes. The fact that most human orthologs of glycosyltransferases genes, including sialyltransferases, are present in the zebrafish genome enables

glycobiologists to infer their enzymatic activity and facilitates the study of the function of glycosylation in zebrafish. Among others, studies of the role of glycosylation in zebrafish demonstrated that protein *O*-linked *N*-acetylglucosaminylation controls the activity of proteins that regulate apoptosis and epiboly movements in embryos.¹ *O*-mannosylation is necessary for normal embryonic development, since the inhibition of protein *O*-mannosyltransferase activities induces severe phenotypes in embryos.² Terminal polysialylation of the *N*-glycans of the neural cell adhesion molecule is required for a wide range of processes in developing animals including axon fasciculation and commissural axonal guidance,³ myotome formation,⁴ genesis of retina^{5,6} and neuronal migration not only in embryos but also in adult fishes.⁷ Similarly, core fucosylation of *N*-glycans appears to be required for proper midline patterning during embryogenesis.⁸ Besides, β (1,4)galactosylation is

Received: September 20, 2011

Published: February 21, 2012

required for both proper patterning of the dorsoventral axis⁹ and cell migration during convergent extension movements.¹⁰ Consequently, considering the clear involvement of glycoconjugates in a wealth of developmentally linked processes, zebrafish now appears as a promising model for studying glycosylation related human pathologies. In particular, zebrafish is nowadays used as a model for the study of muscular dystrophies,^{11–14} skeletal disorders¹⁵ or neuromuscular transmission defects.¹⁶ Recognition of glycoconjugates as fundamental effectors of embryonic development in zebrafish has led to the identification of species-specific glycan motifs associated to glycoproteins and glycolipids.^{17–19} In particular, glycomic survey of embryos showed the prevalence of highly sialylated glycans with unusual motifs such as the nonreducing Gal β 1–4(Neu5Ac/Gc α 2–3)Gal β 1–4(Fuca1–3)GlcNAc sequence in N-glycans and Fuca1–3GalNAc β 1–4(Neu5Ac/Gc α 2–3)Gal sequence in O-glycans.¹⁸ Furthermore, stage-specific comparison showed that sialylation status of glycoproteins and glycolipids evolved in opposite directions along embryonic development¹⁹ and that Lewis x fucosylation was strictly regulated during the embryos segmentation period.²⁰

Accompanying the rapid development of zebrafish as a model organism for the biology of vertebrates, a set of spontaneously immortalized cell lines were established from adult zebrafish as new toolboxes aimed at the molecular deciphering of the biological processes observed *in vivo*.²¹ In contrast, most vertebrate cell lines are transformed and thus exhibit different gene expression than the original cells. Furthermore, being maintained at room temperature in atmospheric CO₂ and less subjected to contaminations compared to mammalian cell lines, they appear as very attractive to many laboratory applications. Finally, transparency of zebrafish embryos permits the use of these cells for *in vivo* studies after allo-transplantation.²² Among zebrafish cell models are the pioneering ZFL cells derived from normal adult zebrafish liver,²³ that have been rapidly adopted as an excellent tool for toxicological,^{24,25} pharmaceutical^{22,26} or regulation of transcriptional activities²⁷ studies. However, despite their obvious interest in biomedical studies, zebrafish cell lines are still under-exploited and limited in their applications, including in the field of glycobiology, due to the lack of genomic and biochemical data. As a first approach toward the use of zebrafish cell lines as a platform for the molecular deciphering of the functions of glycoconjugates, we initiated a broad glycomic analysis of the zebrafish liver cell line ZFL. In the present study, we report (i) the structural profiling of major glycans including N-glycans, O-glycans and glycolipids, (ii) the expression pattern of all glycosyltransferases potentially involved in the terminal decoration of identified glycans including sialyl- and fucosyltransferases and (iii) the amenability of this cell line to metabolic labeling using functionalized sialic acid analogues.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Nucleospin RNA II kit was from Macherey-Nagel (Hoerd, France). Oligonucleotides were synthesized and purified by Eurogentec (Herstal, Belgium). Taq Core kit DNA Taq polymerase was from Qiagen (Courtaboeuf, France) and pCR2.1-TOPO vector (TOPO TA Cloning from Invitrogen, Cergy Pontoise, France). AffinityScript Q-PCR cDNA synthesis kit, RNA 6000 Nano LabChip Kit and Agilent Bioanalyzer are from Stratagene (Agilent technologies, La Jolla, CA). NanoDrop ND-1000 visible spectrophotometer (NanoDrop technologies,

Wilmington, DE). For purification of glycans and glycolipids, C18 Sep-Pak (Waters, Milford, MA) and Carbograph (Alltech) SPE cartridges were used. Bulk Dowex 50 \times 2 and 50 \times 8 resins used for cation-exchange chromatography were purchased from Sigma-Aldrich. C18 HPLC column was purchased from Grace (Deerfield, MI) and CP-Sil5 CB GC column from Chrompack France (Les Ulis, France).

Cell Culture

The zebrafish (*Danio rerio*) liver cell line ZFL²³ was obtained from ATCC (ATCC number: CRL2643) (LGC standards, Molsheim, France). Cells were cultured in 50% Leibovitz L-15 (ATCC), 35% DMEM (Gibco), and 15% Ham F-12 (Gibco), supplemented with 15 mM HEPES, 0.15 g/L NaHCO₃, 0.01 mg/mL insulin, 50 ng/mL epidermal growth factor (EGF), and 5% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) as proposed by ATCC. Cells were cultured at 28 °C in 75 cm² cell culture flasks. Cells were subcultured every 5–7 days. For this purpose, they were first rinsed with 1 mL of 0.25% trypsin EDTA (Gibco) and then detached with 1 mL of trypsin EDTA. Trypsin digestion was stopped by adding 5 mL of 10% FBS containing medium.

Purification of Glycoconjugates

Purification method was adapted from the glycome analysis of zebrafish embryos.¹⁸ About 60 million of ZFL cells (dry weight 13.6 mg) were scrapped from Petri dishes with a rubber policeman, washed with Phosphate Buffered Saline (PBS, 3.2 mM Na₂HPO₄, 0.5 mM KH₂PO₄, 1.3 mM KCl, 135 mM NaCl, pH 7.4) and centrifuged at 400 \times g. Cellular pellets were dried and sequentially extracted three times by 2 mL of chloroform/methanol (2:1, v/v) and 2 mL of chloroform/methanol (1:2, v/v). Pellets contained glycoproteins whereas supernatant contained glycolipids. The glycoprotein fraction was suspended in Tris/HCl 10 mM pH 7.4 and centrifuged at 600 g. Supernatant was precipitated with 70% ethanol at –20 °C overnight and centrifuged at 1200 \times g. Cytosolic sialic acid was recovered from the ethanolic supernatant whereas Tris/HCl soluble glycoproteins were recovered in the pellets as previously described.²⁸ The Tris/HCl soluble and insoluble glycoproteins were pooled in a single fraction, which was resuspended in a solution of 6 M guanidinium chloride and 5 mM EDTA in 0.1 M Tris/HCl, pH 8, and agitated for 4 h at 4 °C. Dithiothreitol was then added to a final concentration of 20 mM and incubated for 5 h at 37 °C, followed by the addition of iodoacetamide to a final concentration of 50 mM and further incubated overnight in the dark at room temperature. Reduced/alkylated sample was dialyzed against water at 4 °C for three days and lyophilized. The recovered protein samples were then sequentially digested by TPCK (L-(tosylamido-2-phenyl) ethyl chloromethyl ketone) treated trypsin (7.5 U for 1 mg of proteins digest) for 5 h and chymotrypsin (1 U for 1 mg of proteins digest) overnight at 37 °C, in 50 mM ammonium bicarbonate buffer, pH 8.4. Crude peptide fraction was separated from hydrophilic components on a C18 Sep-Pak cartridge (Waters; 500 mg) equilibrated in 5% acetic acid by extensive washing in the same solvent and eluted with a stepwise gradient of 20, 40 and 60% propan-1-ol in 5% acetic acid. Pooled propan-1-ol fractions were dried and subjected to N-glycosidase F (Roche) digestion in 50 mM ammonium bicarbonate buffer pH 8.4, overnight at 37 °C. The released N-glycans were separated from peptides using the same C18 Sep-Pak procedure as described above. To liberate O-glycans, retained peptide fraction from C18 Sep-Pak was submitted to alkaline reductive elimination in 100 mM NaOH containing 1.0 M sodium borohydride at 37 °C for

72 h. The reaction was stopped by adding Dowex 50 × 8 cation-exchange resin (25–50 mesh, H⁺ form) until pH 6.5 is reached. After evaporation to dryness, boric acid was distilled as its methyl ester in the presence of methanol. Total material was then submitted to cation-exchange chromatography on a Dowex 50 × 2 column (200–400 mesh, H⁺ form) to remove residual peptides.

The combined chloroform/methanol (2:1, v/v) and chloroform/methanol (1:2, v/v) glycolipid containing fraction was de-O-acylated with 0.1 M NaOH in chloroform/methanol (1:1, v/v; 1 mL) at 37 °C for 2 h and purified on a C18 Sep-Pak cartridge (Waters; 500 mg). The cartridge was washed with methanol/water (1:1, v/v; 12 mL) and eluted successively by methanol (4 mL), chloroform/methanol (1:1, v/v; 4 mL) and (2:1, v/v; 4 mL). Purified glycolipids were digested by 20 mU (20 μL) of Endoglycosamidase II from *Rhodococcus sp.* (Sigma) in 80 μL of 50 mM aqueous sodium acetate with 0.1% of sodium taurodeoxycholate (Sigma) at pH 5 at 37 °C for 72 h. Released glycans were successively cleaned up on C18 Sep-Pak (Waters; 500 mg) and Carbograph (Alltech; 150 mg) cartridges. Briefly, sample was injected onto a C18 Sep-Pak cartridge equilibrated in methanol/water (1:1, v/v) and eluted with methanol in water (1:1, v/v; 4 mL). The collected fraction was dried, reconstituted in 1 mL of water and injected onto a Carbograph cartridge equilibrated in water. Cartridge was rinsed with 12 mL of water and eluted with 6 mL of a solution of acetonitrile in water (1:3, v/v). The acetonitrile solution that contained the glycans was dried.

Exoglycosidases Treatments

PNGaseF released N-glycans were digested with 20 mU of neuraminidase from *Arthrobacter ureafaciens* (GE) in 100 μL of 50 mM sodium acetate buffer, pH 5.5, at 37 °C for 16–18 h. Desialylated N-glycans were further treated with 3 mU of β1–4 galactosidase from *Streptococcus pneumoniae* (Calbiochem) in 100 μL of 50 mM sodium acetate buffer, pH 5.5, at 37 °C for 12 h.

Lipid Analysis

The lipid moiety of glycolipids was analyzed by GC–MS as trimethylsilylated derivative. Glycolipids were methanolysed (1 mL of MeOH/HCl 0.5 M) at 80 °C for 16 h, neutralized by silver carbonate and N-acetylated by 20 μL of acetic anhydride. The fatty acids were extracted with 200 μL of heptanes, dried under nitrogen and derivatized by 30 μL BisSilylTriFluoro-Acetamide (BSTFA, Sigma-Aldrich) in 30 μL of pyridine for 2 h before analysis by GC–MS.

GC/MS Analysis

For GC/MS analysis, the GC separation was performed on a Carlo Erba gas chromatograph equipped with a 25 m × 0.32 mm CP-Sil5 CB Low bleed/MS capillary column, 0.25 μm film phase (Chrompack France, Les Ulis, France). The temperature of the injector was 280 °C and the samples were analyzed using the following temperature program: 90 °C for 3 min then 5 °C/min until 260 °C. The column was coupled to a Finnigan Automass II mass spectrometer for routine analysis. The analyses were performed in electronic impact (EI) mode (ionization energy 70 eV; source temperature 150 °C). The qualitative and quantitative analyses of the GC–MS data were obtained with the Xcalibur software (Thermo-Finnigan; Les Ulis, France).

Mass Spectrometry Analyses of Glycans

For MALDI-MS analyses, the glycan samples were permethylated using the NaOH/dimethyl sulfoxide reagent.²⁹ The permethylated derivatives were then extracted in chloroform

and repeatedly washed with water. MALDI-TOF mass spectra were acquired on voyager Elite DE-STR mass spectrometer (Perspective Biosystems, Framingham, MA) and MALDI-TOF/TOF analyses on 4800 Proteomics Analyzer mass spectrometer (Applied Biosystems, Framingham, MA) in reflectron positive mode by delayed extraction using an acceleration mode of 20 kV, a pulse delay of 200 ns and grid voltage of 66%. Samples were prepared by mixing directly on target 1 μL of glycan solution (1–5 pmol) with 1 μL of 2,5 dihydroxybenzoic acid matrix solution (10 mg/mL in CH₃OH/H₂O, 50/50, vol/vol). Between 50 and 100 scans were averaged for every spectrum. MALDI-Q/MS glycan sequencing was performed on Q-ToF Ultima MALDI instrument (Micromass) in which the permethylated samples in acetonitrile were mixed 1:1 with DHB (10 mg/mL in 50% acetonitrile/0.1% trifluoroacetic acid) for spotting onto the target plate. Argon was used as the collision gas with a collision energy manually adjusted (between 50–200 V) to achieve optimum degree of fragmentation for the parent ions under investigation.

NMR Analysis

NMR experiments were performed at 300 K on Bruker AvanceIII 900 MHz spectrometer equipped with a 5 mm triple-resonance cryoprobe. Prior to NMR spectroscopic analyses into deuterium, oligosaccharides were repeatedly exchanged in ²H₂O (99.97% ²H, Euriso-top, Saint-Aubin, France) with intermediate freeze-drying and finally dissolved in ²H₂O and transferred in Shigemi tubes (Allison Park, USA). Chemical shifts (ppm) were calibrated using acetone as internal standard ($\delta^1\text{H}$ 2.225 and $\delta^{13}\text{C}$ 31.55 ppm).

Isolation of RNA, cDNA Synthesis and PCR Analysis

Total RNA was extracted from ZFL cells using the Nucleospin RNA II kit mRNA. Cellular RNA was quantified using a NanoDrop ND-1000 visible spectrophotometer. The integrity of RNA was assessed using the RNA 6000 Nano LabChip Kit on an Agilent Bioanalyzer. For subsequent PCR amplifications, first strand cDNA was synthesized from total RNA using an oligo(dT) primer and the AffinityScript Q-PCR cDNA synthesis kit according to the manufacturer protocol. Based on the nucleic acid sequences determined *in silico*, oligonucleotide primers were designed in the open reading frame of sialyltransferases and fucosyltransferases (Table S1, Supporting Information). PCR amplifications were carried out for 35 cycles with the Taq Core kit DNA polymerase using buffer solutions provided by the manufacturer. Annealing temperatures ranged from 50 to 58 °C (Table S1) and amplified fragments were subjected to 1.5% agarose gel electrophoresis, visualized by ethidium bromide, gel-extracted and subcloned in the pCR2.1-TOPO vector. Nucleotide sequences were confirmed by sequencing (Genoscreen, Lille, France).

Synthesis of SiaNAI and 3-Azidopropyl Biotin Amide

ManNAI or N-4-Pentynoilmannosamine (30% final yield) was obtained by reacting a mixture of D-mannosamine hydrochloride, N-succinimidyl-4-pentynoate, and triethylamine in DMF (N,N-dimethylformamide) at room temperature overnight. Synthesis of N-4-pentynoynneuraminic acid (SiaNAI) was then achieved according to an adapted procedure described by Chang et al.³⁰ In brief, biosynthesis of SiaNAI from ManNAI (35% final yield) was catalyzed by Neu5Ac aldolase (EC 4.1.3.3) in the presence of sodium pyruvate and NaN₃ in potassium phosphate buffer. SiaNAI was purified by anion-exchange chromatography (AG-1 X2 resin; Bio-Rad) using a

gradient of formic acid in water from 1.0 to 2.5 M. Fractions were analyzed for the presence of SiaNAI using the periodate-resorcinol method. Only the β -anomer was obtained (Figure S1, Supporting Information).

3-azidopropyl biotin amide was obtained according to the reported procedure of Hsu et al.³¹ In brief, biotin was reacted with the Hünig's base DIEA (= *N,N*-diisopropylethylamine), the common peptide coupling reagent HBTU (= *O*-benzotriazole-*N,N,N',N'*-tetramethyl-uronium hexafluorophosphate) and 1-azido-3-aminopropane in DMF at room temperature for 2 h to afford 3-azidopropyl biotin amide (45% final yield). The purity of synthesized compounds was assessed by ¹H and ¹³C NMR and MALDI-TOF-MS; all spectra are provided in the Supporting Information (Figures S1 and S2).

Dosage of Sialic Acids

Intact sialic acids were liberated by mild hydrolysis in 0.1 M TFA at 80 °C and coupled to DMB. For DMB derivatization, sialic acids reacted with a volume of DMB reagent at 50 °C for 2 h 30 min, then separated isocratically on a C18 reverse phase HPLC column (250 × 4.6 mm, 5 μ m, Vydac) by a solvent mixture of acetonitrile/methanol/water (7:9:84) and identified by referring to the elution positions of standard Neu5Ac, Neu5Gc and SiaNAI derivatives.³² Periodate oxidation and C7/C9 analyses for oligosialyl linkage determination were performed essentially as described by Sato et al. (1998).³³ Briefly, *O*-glycans were dissolved in a mixture of 25 μ L of 40 mM sodium acetate buffer (pH 5.5) and 2 μ L of 0.2 M sodium metaperiodate and left at 0 °C for 45 min in the dark. Five microliters of 5% glycerol were then added and allowed to react for another 40 min at 0 °C, followed by 32 μ L of 0.2 M sodium borohydride in 0.2 M sodium borate buffer (pH 8.0) and left overnight at 0 °C. Finally, TFA was added to a final concentration of 0.1 M and incubated at 80 °C for 1 h before subjected to DMB derivatization.

Cell Imaging

Zebrafish Liver Cells (ZFL) were seeded onto six-well plates containing glass coverslips and cultivated in a growth medium supplemented with or without 0.1 mg/mL of alkynyl-modified sugar (SiaNAI). After 2 days growth on coverslips, cells were fixed and permeabilized with acetone for 10 min at -20 °C, then subjected to the probe labeling reaction: 0.1 mM biotin-azide/0.1 mM Tris-triazoleamine catalyst/1 mM CuSO₄/2 mM

sodium ascorbate, in PBS, at room temperature for 30 min. Subsequently, the fixed and labeled cells were rinsed with PBS and stained with fluorescein-conjugated streptavidin (2 μ g/mL in 5% BSA/PBS) at room temperature for 30 min. Mowiol4-88 (Merck) was added on coverslip before visualization on microscope (λ_{exc} 488 nm, λ_{em} 518 nm).

RESULTS

1. Glycome Survey

Our overall glycomic survey mapping strategy of the ZFL cells involved the sequential extraction of glycolipids and glycoproteins and the subsequent sequential release of *N*- and *O*-glycans from the proteolytic-digested peptides/glycopeptides mixtures.¹⁸ Glycolipids and released glycans were permethylated before mass spectrometry analysis in order to allow more informative MS/MS sequencing.³⁴

1.1. Glycolipids. Glycolipids were extracted, purified and permethylated prior to analysis. Monosaccharide composition analysis of total glycolipids established the presence of galactose (Gal), glucose (Glc), *N*-acetylglucosamine (GlcNAc), *N*-acetylgalactosamine (GalNAc) and sialic acid in a 28/24/20/23/5 molar ratio. Analysis of sialic acids by reverse phase HPLC after coupling to DMB established that sialic acid was constituted by about 90% of Neu5Ac and 10% of Neu5Gc (data not shown). The analysis of the lipid moiety by GC/MS showed that the ceramides were constituted by a single type of sphingoid base 4-sphingosine d18:1 and two different fatty acyl chains (data not shown). Then, intact glycolipids were permethylated and analyzed by MALDI-TOF mass spectrometry. As shown in Figure 1, ZFL cells showed a complex mass spectrometry pattern of glycosphingolipids dominated by two $[M + Na]^+$ signals at *m/z* 1616.9 and 1727.0 both tentatively attributed to the monosialylated gangliosides GM2. The 110 m.u. difference observed between these two components corresponds to six -CH₂- and one -CH=CH- and was attributed to a difference in the fatty acids associated to their respective ceramide moieties. In accordance with the identification of the ceramide base by GC-MS, these data showed that glycosphingolipids are substituted by a 4-sphingosine d18:1 base *N*-acylated by either a C16:0 or a C24:1 fatty acid. MS/MS fragmentation analysis in MALDI-TOF/TOF of signals at *m/z* 1617 and 1727 confirmed that both components bore similar oligosaccharides, but differed by their respective lipid moieties.

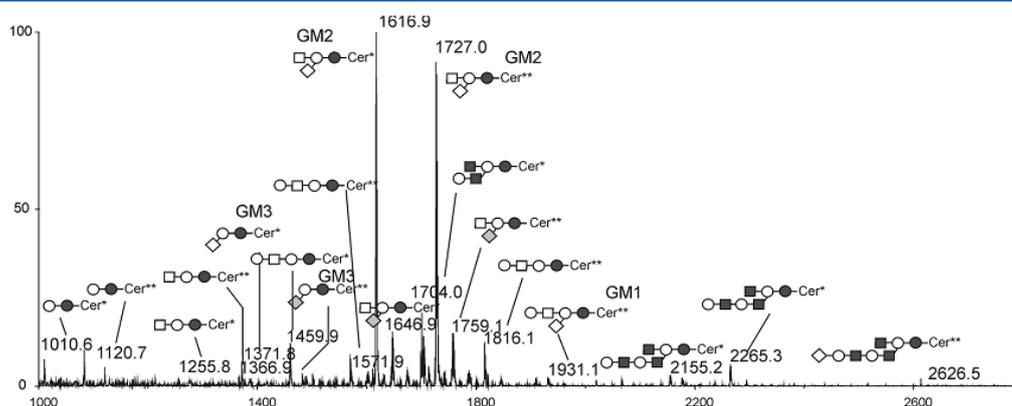


Figure 1. MS Profile of permethylated glycosphingolipids. All GSLs are present as d18:1/C16:0 (*Ceramide at *m/z* 548) and d18:1/C24:1 (**Ceramide at *m/z* 658) isomers. Compositions of glycolipids are summarized in Table 1. O, Gal; ●, Glc; □, GalNAc; ■, GlcNAc; ◇, Neu5Ac; ◆, Neu5Gc.

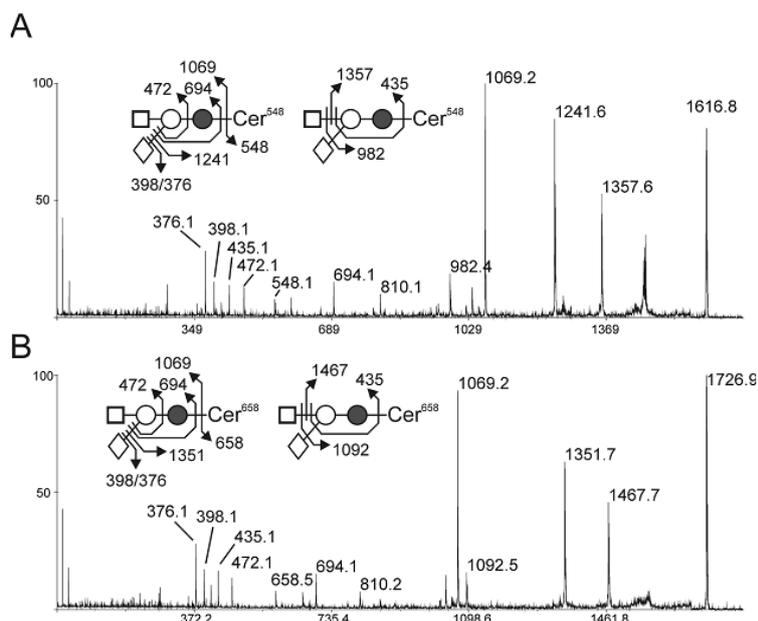


Figure 2. MS/MS sequencing of permethylated glycosphingolipids. Analysis of the two GM2 (GL7) isomers at (A) m/z 1616 (B) and 1726 established that the 110 mass unit difference originates from the ceramide moieties at m/z 548 (d18:1/C16:0) or m/z 658 (d18:1/C24:1).

As shown in Figure 2, fragmentation pattern of the signal at m/z 1617 showed that this molecule comprised a glycan observed as a sodiated fragment ion signal at m/z 1069 and a lipid domain observed as a protonated fragment ion signal at m/z 548. MS/MS analysis of the signal at m/z 1727 established that it contained a similar glycan moiety at m/z 1069 but a different ceramide at m/z $[M + H]^+$ 658. Furthermore, comparison of the fragmentation patterns of the oligosaccharide moieties confirmed that they are both constituted by an HexNAc-[Neu5Ac]Hex-Hex sequence, in total accordance with the canonical GM2 ganglioside GalNAc(β 1,4)[Neu5Ac(α 2,3)]Gal(β 1,4)Glc(β 1)Cer widely found in vertebrates. All Y-type fragments that contain the ceramide domain from the two GM2 isomers also differed by 110 m.u. (793/903; 1242/1352; 1358/1468), which further confirmed that the two isomers only differ by the structure of their lipid anchor. Similarly, all other sphingo-glycolipids were observed as two molecular ion signals differing by 110 m.u., which established that they all occur as two d18:1/C16:0 and d18:1/C24:1 isomers (Table 1).

To obtain simpler fragmentation mass spectra without interference of the lipid moiety and to gain more insight into the structure of minor components, we enzymatically removed the ceramide part before further analysis. Following the permethylation of resulting glycans, MALDI-TOF MS spectrum showed an oligosaccharide profile comparable to the one obtained from intact permethylated glycolipids (GLs) in which most components previously identified can be observed (Figure 3, Table 1). Altogether, MS analyses of intact and deacylated glycolipids permitted the identification of 17 components presenting distinct oligosaccharide moieties. In particular, along with the ganglio series glycolipids (GA2, GA1, GM3, GM2 and GM1), a series of neutral and monosialylated glycolipids presenting an unusual composition (Compounds [Cpds] GL6, GL9, GL11, GL13-17) can be observed both as intact and deacylated molecules. Their monosaccharide compositions suggest that their structures are based on (neo)lactoganglio series

(n)LcGgCer (GlcNAc(β 1,3)[GlcNAc(β 1,4)]Gal(β 1,4)Glc(β 1)Cer (Cpds GL6, GL9, GL11) potentially further substituted by LacNAc motifs (Cpd GL15) and Neu5Ac/Gc residues (Cpds GL13, GL14, GL16, GL17). MALDI-QTOF MS/MS fragmentation of the deacylated compounds GL6 and GL9 clearly established that this family of glycolipids comprised a Lac core disubstituted by two *N*-acetylhexosamine residues on the Gal residue (Figure 3). As shown in Figure 3, major B/Y fragment ions at m/z 486/708 and 935/708 for GL9 and GL15 established that one branch was always a single HexNAc residue, whereas the other was a LacNAc motif that may be further elongated by LacNAc motifs or/and by sialic acid residues for sialylated equivalents (e.g., GL16, Figure 3D). The absence of Z-type ion resulting from the release of terminal nonreducing Hex residue from GL9 and GL15 clearly typified the lactosamine motifs as type-2 neoLacNAc Gal(β 1-4)GlcNAc. Finally, the respective positions of the HexNAc and LacNAc branches on the Gal-C4 and Gal-C3 of the Lac motif was clearly established by MALDI-TOF/TOF fragmentation of GL9 and GL15. Indeed, the D-type C/Z double cleavages that specifically release the substituent at C3 position are clearly observed at m/z 472 and 921, which indicated that LacNAc branches are linked to the C3 position of Gal residue (Figure S3, Supporting Information).³⁴

Altogether, the collected data established that ZFL cells synthesize not only classical monosialylated gangliosides, but also a family of unusual glycosphingolipids with structural features similar to those of the neolactoganglio series. They all appear to be based on the (n)LcGg₅Cer Gal(β 1,4)GlcNAc(β 1,3)[GlcNAc(β 1,4)]Gal(β 1,4)Glc(β 1)Cer core that may be further elongated by Gal(β 1,4)GlcNAc(β 1,3) or Neu5Ac/Gc residues on the terminal Gal residue of LacNAc sequence.

1.2. N-Glycans. Mass spectrometry profiling of the permethylated derivatives of *N*-glycans released from ZFL cells led to the identification of three different families of molecules, that is, oligomannosylated type (NG1-4), complex type (NG5-11) and complex type *N*-glycans with additional hexose residues

Table 1. Composition of Glycolipids^a

<i>m/z</i> [M + Na] ⁺		composition	Cpd	series
glycolipids	glycans			
1010	nd	Hex ₂ -Cer ⁵⁴⁸	GL1	
1120		Hex ₂ -Cer ⁶⁵⁸		
1255	722	Hex ₂ HexNAc ₁ -Cer ⁵⁴⁸	GL2	GgCer
1365		Hex ₁ HexNAc ₁ -Cer ⁶⁵⁸		
1371	838	Neu5Ac ₁ Hex ₂ -cer ⁵⁴⁸	GL3	GgCer
1481		Neu5Ac ₁ Hex ₂ -cer ⁶⁵⁸		
1401	nd	Neu5Gc ₁ Hex ₂ -cer ⁵⁴⁸	GL4	GgCer
1511		Neu5Gc ₁ Hex ₂ -cer ⁶⁵⁸		
1458	926	Hex ₃ HexNAc ₁ -Cer ⁵⁴⁸	GL5	GgCer
1568		Hex ₃ HexNAc ₁ -Cer ⁶⁵⁸		
1501	967	Hex ₂ HexNAc ₂ -Cer ⁵⁴⁸	GL6	LcGg-Cer
1611		Hex ₂ HexNAc ₂ -Cer ⁶⁵⁸		
1617	1083	Neu5Ac ₁ Hex ₂ HexNAc ₁ -Cer ⁵⁴⁸	GL7	GgCer
1727		Neu5Ac ₁ Hex ₂ HexNAc ₁ -Cer ⁶⁵⁸		
1647	1113	Neu5Gc ₁ Hex ₂ HexNAc ₁ -Cer ⁵⁴⁸	GL8	GgCer
1757		Neu5Gc ₁ Hex ₂ HexNAc ₁ -Cer ⁶⁵⁸		
1705	1171	Hex ₃ HexNAc ₂ -Cer ⁵⁴⁸	GL9	LcGg-Cer
1815		Hex ₃ HexNAc ₂ -Cer ⁶⁵⁸		
1819	nd	Neu5Ac ₁ Hex ₃ HexNAc ₁ -Cer ⁵⁴⁸	GL10	GgCer
1929		Neu5Ac ₁ Hex ₃ HexNAc ₁ -Cer ⁶⁵⁸		
1910	nd	Hex ₄ HexNAc ₂ -Cer ⁵⁴⁸	GL11	LcGg-Cer
2021		Hex ₄ HexNAc ₂ -Cer ⁶⁵⁸		
1963	nd	Neu5Gc ₁ Hex ₃ HexNAc ₁ -Cer ⁶⁵⁸	GL12	
2067	1532	Neu5Ac ₁ -Hex ₃ HexNAc ₂ -Cer ⁵⁴⁸	GL13	LcGg-Cer
2177		Neu5Ac ₁ -Hex ₃ HexNAc ₂ -Cer ⁶⁵⁸		
2095	1562	Neu5Gc ₁ -Hex ₃ HexNAc ₂ -Cer ⁵⁴⁸	GL14	LcGg-Cer
2207		Neu5Gc ₁ -Hex ₃ HexNAc ₂ -Cer ⁶⁵⁸		
2155	1620	Hex ₄ HexNAc ₃ -Cer ⁵⁴⁸	GL15	LcGg-Cer
2265		Hex ₄ HexNAc ₃ -Cer ⁶⁵⁸		
2517	1981	Neu5Ac ₁ -Hex ₄ HexNAc ₃ -Cer ⁵⁴⁸	GL16	LcGg-Cer
2626		Neu5Ac ₁ -Hex ₄ HexNAc ₃ -Cer ⁶⁵⁸		
2656	2011	Neu5Gc ₁ -Hex ₄ HexNAc ₃ -Cer ⁶⁵⁸	GL17	LcGg-Cer

^aCompositions of glycan and lipid moieties were calculated from the *m/z* values observed for permethylated derivative of each compound (Cpd) before (Glycolipids column) and after (Glycans column) endoceramidase digestion.

(NG12 and NG13) (Figure 4, Figure S4, Supporting Information, Table 2). [M + Na]⁺ signals at *m/z* 2605 (HexNAc₄Hex₅Neu5Ac₁deHex₁), 2792 (HexNAc₄Hex₅Neu5Ac₂), 2966 (HexNAc₄Hex₅Neu5Ac₂deHex₁), 3604 (HexNAc₅Hex₆Neu5Ac₃) and 3779 (HexNAc₅Hex₆Neu5Ac₃deHex₁) were attributed to complex *N*-glycans all presenting typical compositions for vertebrate *N*-glycans but differing by the number of antennae, the presence of a core fucosylation and the number of substituted Neu5Ac residues (1–4). Sequential incubation of total *N*-glycans with neuraminidase and β -1,4-galactosidase generated truncated *N*-glycans substituted by two HexNAc (HexNAc₄Hex₅ at *m/z* 1661 and HexNAc₄Hex₅deHex₁ at *m/z* 1836) or three HexNAc (HexNAc₅Hex₆ at *m/z* 1907 and HexNAc₅Hex₆deHex₁ at *m/z* 2081) residues, which demonstrated the presence of di- and three antennary *N*-glycans (Figure S4 and Table S2, Supporting Information). Furthermore, it also generated a truncated *N*-glycan substituted by four HexNAc residues observed at *m/z* 2326, which established the presence of multisialylated, tetra-antennary complex *N*-glycans that were not observed before enzymatic digestion (Figure S4 and Table S2).

More surprisingly, two clear signals at *m/z* 3345 and 3725 could be assigned as complex biantennary disialylated *N*-glycans presenting one and two fucose residues as well as one and two supernumerary hexose residues respectively. The fragmentation patterns in MALDI-Q/TOF of both signals showed Y fragment ion at *m/z* 472 as well as multiple cleavages ion at *m/z* 1317 that altogether typify the disubstituted monofucosylated Man₃GlcNAc₂Fuc₁ core (Figure 5).³⁴ From the signal at *m/z* 3725, the observation of intense B/Y fragment ions at *m/z* 1225/2521 clearly established the presence of two identical branches HexNAc₁Hex₂Neu5Ac₁deHex₁ in NG13 (Figure 5). The position of sialic acid and deHex residues in the Hex-[Neu5Ac]Hex-[deHex]HexNAc sequence was then confirmed by the observation of secondary loss ions at *m/z* 449 and 850. Fragmentation of signal at *m/z* 3345 established that this compound contained a fucosylated core similar to the former one, but substituted by one Hex-[Neu5Ac]Hex-[deHex]HexNAc and one [Neu5Ac]Hex-HexNAc branches. The sequences of these two *N*-glycans are potentially reminiscent of the *N*-glycans previously isolated from embryonic glycoproteins of zebrafish that carried the unusual terminal motif Gal(β 1,4)[Neu5Ac(α 2,3)]Gal(β 1–4)[Fuc(α 1,3)]GlcNAc.¹⁸ Enzymatic desialylation of total *N*-glycans uncovered a larger family of compounds substituted by terminal Hex-Hex motives at *m/z* 3521, 3451, 3071, 3000, and 2623 (Table S2, Supporting Information). Digestion by β -1,4-galactosidase released all terminal Hex residues from di- and triantennary *N*-glycans observed at *m/z* 3451 and 3521 to generate truncated *N*-glycans at *m/z* 3041 and 2908, which demonstrated the presence of Gal(β 1,4)Gal disaccharides (Figure S4, Supporting Information). Surprisingly, some of the Hex-Hex motives remained intact after β -1,4-galactosidase treatment. In particular, MS/MS analysis of reaction product at *m/z* 2797 established that the digestion of the biantennary *N*-glycan [Gal-Gal(β 1–4)[Fuc(α 1,3)]GlcNAc] released only one terminal Gal residue out of two (Figure S5B, Supporting Information). Similarly, one Gal-Gal motif of the reaction product at *m/z* 2664 appeared resistant to β -1,4-galactosidase digestion (Figure S5A). It is noteworthy that the absence of Z fragment ions at M-236 in both fragmentation patterns disclosed the possibility that the terminal Hex residue was linked *via* a (1–3) linkage. Altogether, combination of enzymatic degradation and MS/MS analysis of digestion products clearly established the presence of the previously described Gal(β 1,4)[Neu5Ac(α 2,3)]Gal(β 1–4)[Fuc(α 1,3)]GlcNAc “zebrafish glyco-epitope” in ZFL cell line. However, the partial resistance to β -1,4-galactosidase activity displayed by the terminal Gal-Gal motif substituting some of the *N*-glycans remains unclear and may be due either to the presence of another linkage pattern than Gal(β 1,4)Gal or to a as yet not described fine specificity of the used enzyme.

1.3. O-Glycans. Following the enzymatic release of *N*-glycans from glycopeptides, *O*-glycans were released from resulting glycopeptides as oligoglycosyl alditols by reductive β -elimination. MALDI-MS analysis of their permethylated derivatives showed a very simple *O*-glycan profile dominated by signals at *m/z* 895 and 1256 tentatively attributed to *O*-glycans Neu5Ac₁Hex₁HexNAc-ol and Neu5Ac₂Hex₁HexNAc-ol (Figure 6A). MS/MS fragmentation of the monosialylated *O*-glycan at *m/z* 895 established that the Neu5Ac was located at the C6 position of the HexNAc-ol residue, whereas the Hex residue was linked to the HexNAc-ol in C3 position, based on the Y and Z fragment ions at *m/z* 520 and 659 (data not shown). Similarly, the disialylated *O*-glycan at *m/z* 1256 was identified as Neu5Ac-Hex-[Neu5Ac]HexNAc-ol based on its

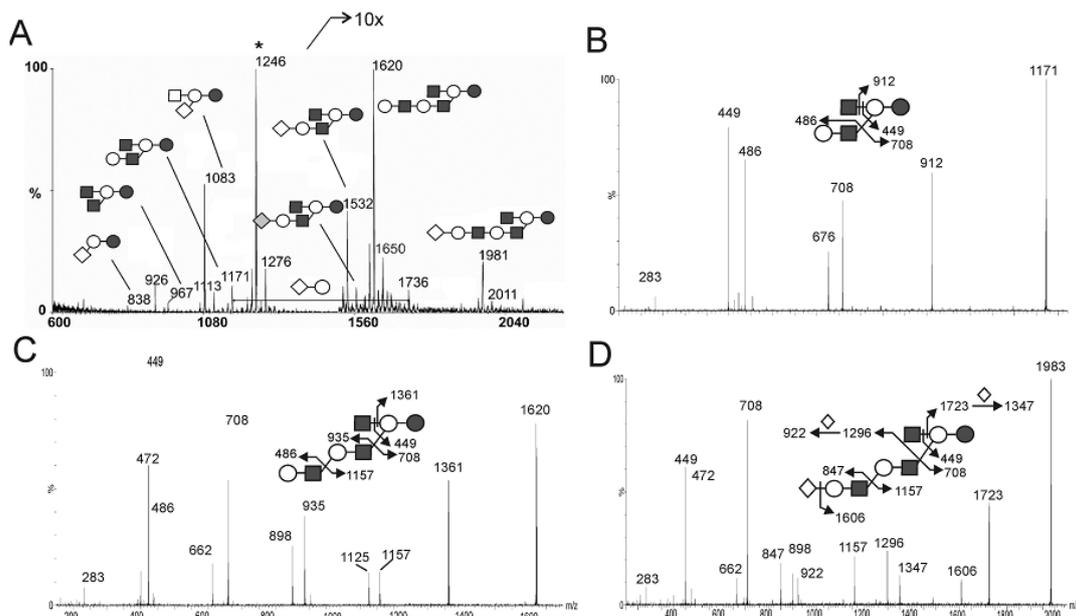


Figure 3. MS analysis of permethylated glycans from GSL. MALDI-TOF profiling of permethylated glycan moieties isolated from (A) GSL and MS/MS fragmentations analyses of (B–D) GL9, GL15 and GL16 in MALDI-QTOF typified the GSLs from ZFL as two families: ganglio-series (GM1–3) and neolactoganglio series (nLcGgCer). *, contaminant signal.

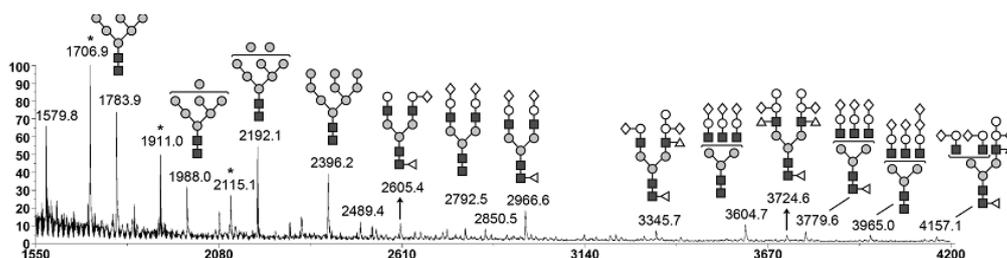
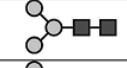


Figure 4. MALDI-MS profile of permethylated *N*-glycans from ZFL cells. ZFL *N*-Glycans consist of three families of molecules; oligomannosylated type, “classical” complex type and complex type with supplementary Hex residues. Complex type *N*-glycans are bi- and triantennary and may be core-fucosylated. Structure of *N*-glycans are summarized in Table 2. ○, Gal; ●, Man; ■, GlcNAc; ◇, Neu5Ac.

fragmentation pattern (data not shown). Accordingly, ^1H NMR analysis of total glycan mixture showed the presence of two *O*-glycans **OG1** and **OG2** in equivalent quantity. The ^1H spin systems of molecules established by ^1H – ^1H COSY NMR experiment demonstrated that both *O*-glycans contained a GalNAc-ol residue substituted by a Neu5Ac(α 2,6) residue and a Gal(β 1,3) residue. **OG1** and **OG2** differed by the nature of their Gal residue, which was nonsubstituted in **OG1** (H2/H3 at δ 3.578/3.672), but substituted by Neu5Ac(α 2,3) in **OG2** (H2/H3 at δ 3.609/4.116). Accordingly, Neu5Ac(α 2,3) and Neu5Ac(α 2,6) were identified owing to their different $\text{H}_{3,\text{ax}}/\text{H}_{3,\text{eq}}$ ^1H parameters at δ 1.801/2.774 and 1.692/2.728, respectively (Table 3). Finally, the calculated SOACS/SOACS-ol indexes of **OG1** at 6.165/10.544 ppm and **OG2** at 8.034/12.413 ppm perfectly matched with the oligosaccharides **9** and **85** reported by Kamerling and Vliegthart.^{35,36} Altogether, NMR and MS analyses established that the two major *O*-glycans **OG1** and **OG2** synthesized by ZFL cells are Gal(β 1,3)[Neu5Ac(α 2,6)]GalNAc-ol and Neu5Ac(α 2,3)-Gal(β 1,3)[Neu5Ac(α 2,6)]GalNAc-ol.

In addition to the major *O*-glycans **OG1** and **OG2**, two minor *O*-glycans signals were identified by mass spectrometry analysis of permethylated derivatives at m/z 1617 and 1979 and tentatively assigned as Neu5Ac₃Hex₁HexNAc-ol (**OG3**) and Neu5Ac₄Hex₁HexNAc-ol (**OG4**). As shown in Figure 6B, MS/MS fragmentation of permethylated **OG4** clearly established that this *O*-glycan is an extension of **OG2** with an additional Neu5Ac residue on each sialic acid to produce a tetrasialylated molecule Neu5Ac-Neu5Ac(α 2,3)Gal(β 1,3)[Neu5Ac-Neu5Ac(α 2,6)]-GalNAc-ol. Finally, **OG3** was shown to be a mixture of two trisialylated isobaric extension of **OG2** by an extra Neu5Ac residue either on the Neu5Ac(α 2,3) or the Neu5Ac(α 2,6) residue (data not shown). The nature of the Sia-Sia linkage was addressed by mild periodic oxidation of total *O*-glycans and subsequent analysis of the resulting C7(Neu5Ac) and C9(Neu5Ac) as DMB derivatives, as previously described.^{19,33} Peak integration of the C9-(Neu5Ac)-DMB and C7(Neu5Ac)-DMB signals permitted us to calculate the presence of one (α 2,8)substituted Neu5Ac for 6 non substituted Neu5Ac residues (data not shown), which strongly

Table 2. Composition of N-Glycans Calculated from the *m/z* Values of Their Permethylated Derivatives

	<i>m/z</i> [M+Na] ⁺	Core	Antennae	Cpd
Oligomannosylated	1784		3x 	NG1
	1988		4x 	NG2
	2192		5x 	NG3
	2396		6x 	NG4
Complex	2605			NG5
	2792		2x 	NG6
	2850			NG7
	2966		2x 	NG8
	3604		3x 	NG9
	3779		3x 	NG10
	3965		2x 	NG11
Complex with supplementary hexose	3345			NG12
	3724		2x 	NG13

supports that **OG3** and **OG4** are substituted by Neu5Ac(α 2,8)-Neu5Ac disialylated motifs, as previously established in embryos.¹⁹

2. Glycosyltransferase Survey

Based on the glycan structures expressed by ZFL cells, we investigated the set of glycosyltransferases involved in the terminal glycosylation of all glycoconjugates. In particular, we focused our attention on the sialylation that decorates all types of glycans identified in ZFL cells and on the fucosylation of N-glycans. In order to determine which sialyltransferases and fucosyltransferases genes are expressed in ZFL cells, we carried out RT-PCR using oligonucleotide primer pairs specific for each glycosyltransferase identified, as indicated in Supporting Information Table S1. As shown in Figure 7A, *st3gal2-r1*, *st3gal3-r2*, *st3gal4* and *st3gal5-r1*, the zebrafish genes corresponding to the human ST3Gal II, ST3Gal III, ST3Gal IV and ST3Gal V, which are α 2,3-sialyltransferases from the ST3Gal family (Table S3, Supporting Information), are expressed in ZFL, whereas none of the ST3Gal I subfamily gene members (*st3gal1-r1*, *st3gal1-r2*, *st3gal1-r3* and *st3gal1-r4*) seems to be expressed. *st6galnac1-r1*, *st6galnac2-r2*, *st6galnac3*, *st6galnac4*, *st6galnac5* and *st6gal2*, the zebrafish genes coding for ST6GalNAc I, ST6GalNAc II, ST6GalNAc III, ST6GalNAc IV, ST6GalNAc V and ST6Gal II, which are α 2,6-sialyltransferases from the ST6GalNAc and ST6Gal families respec-

tively, are also found to be expressed in ZFL as shown in Figure 7B and C, whereas the newly identified zebrafish gene named *st6galnac1-r2* is barely expressed. Finally, the α 2,8-sialyltransferases from the ST8Sia family *st8sia1*, *st8sia2*, the genes corresponding to the mammalian ST8Sia I, ST8Sia II and the fish *st8sia7* gene are almost not amplified, whereas *st8sia6* corresponding to the human ST8Sia VI is expressed in the ZFL cells.

Concerning the expression of fucosyltransferase genes, Figure 7E shows that several zebrafish *fut* mRNAs were detected. All the known members of the α 1,3-fucosyltransferases (Futs) catalyzing the terminal fucosylation of N-glycans in zebrafish, *fut7*, *fut9B*, *fut9C1*, *fut9C2* and *futD* genes are expressed. Similarly, core fucosyltransferases *fut8* and *fut10* known to catalyze in Human the transfer of fucose to the first GlcNAc residue of N-glycans in α 1,6 and α 1,3 positions, respectively, are also expressed.

3. Metabolic Labeling

Metabolic labeling of glycans using alkyne or azide modified monosaccharide precursors recently appeared as an elegant alternative for the study of glycans functions in cell culture.^{37,38} Incorporation of unnatural monosaccharides that can be labeled both at the cell surface and in the purified cell extract provides a new mean to follow and identify potentially novel glycosylation

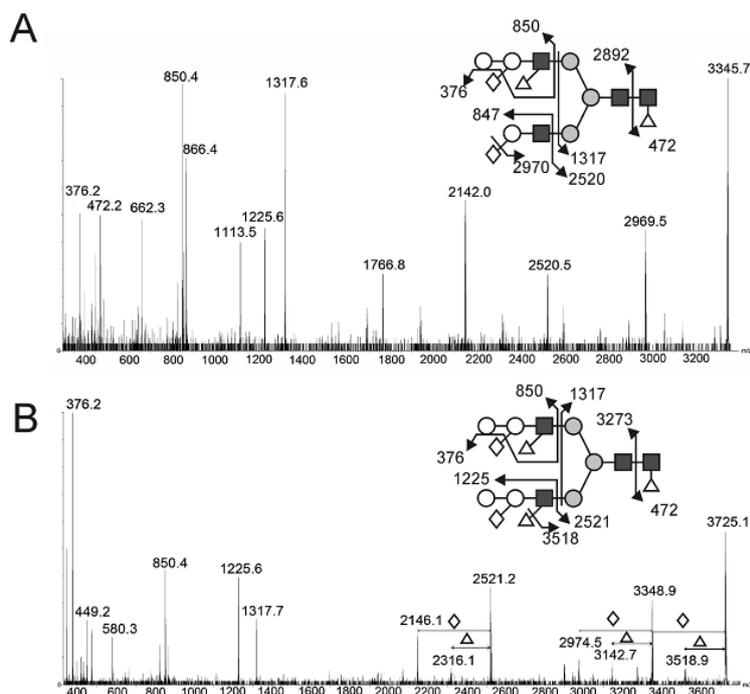


Figure 5. MALDI-MS/MS sequencing of the biantennary complex-type *N*-glycans from ZFL cells. MALDI-Q/TOF analysis of (A) NG12 and (B) NG13 located the supplementary Hex residues at the nonreducing end of the Hex-[Neu5Ac]Hex-[deHex]HexNAc sequence.

forms. As previously demonstrated, the level of unnatural sialic acid incorporation into glycoconjugates varies from one cell type to another; from 5% (COS-7) to 41% (Jurkat) of total sialic acids for cells supplemented with Ac₄ManNAz and from 38% (CHO) to 78% for cells supplemented with SiaNAI (Jurkat).^{30,39} To assess the amenability of ZFL cells to such a strategy, we compared the sialic acids content of glycoconjugates (glycoproteins, glycolipids and soluble glycans) fractions after enrichment of the culture medium with alkynylated sialic acids. This was accomplished by dosing natural and alkynylated sialic acids by reverse phase HPLC after DMB derivatization.³¹ As shown in Figure 8, the glycoconjugates isolated from unlabeled cells are in majority substituted by Neu5Ac (>95%) and low amount of Neu5Gc, in contrast to embryos glycoconjugates that contain a higher amount of Neu5Gc.¹⁸ It is noteworthy that the presence of Kdn was never evidenced by this technique, in accordance with the absence of *N*- and *O*-glycans bearing deaminated sialic acids as established by mass spectrometry analyses. After incubation of ZFL with 0.1 mg/mL of SiaNAI, glycoprotein fraction contained about 45% of alkynylated sialic acid, which demonstrated that ZFL cells efficiently incorporate unnatural exogenous sialic into their own glycoproteins. Labeling of glycoproteins with SiaNAI was confirmed by subjecting the glycoprotein fraction to SDS/PAGE. Glycoproteins labeled with alkynyl sialic acids were visualized after coupling to biotin-azide and incubation with streptavidin HRP (data not shown). Similarly to glycoprotein fraction, SiaNAI was observed as intracellular free sialic acids along Neu5Ac after incubation of cells with SiaNAI, although the Neu5Ac/SiaNAI ratio was lower than in the glycoprotein pool. Screening of all glycoconjugates fractions showed that the incorporation of unnatural sialic acids in glycolipids was much

lower than in glycoproteins and barely detectable. In order to assess that alkyl group of SiaNAI does not interfere with the glycosylation machinery in ZFL, the incorporation efficiency of natural exogenous Neu5Gc, that is known to behave as Neu5Ac during the sialylation process⁴⁰ was checked by supplementing the culture medium with Neu5Gc 0.1 mg/mL. As shown in Figure 8B, the incorporation ratios of Neu5Gc are comparable to those of SiaNAI, albeit a lower endogenous/exogenous sialic acids ratio in glycoprotein and a higher ratio in free intracellular pool of sialic acid. Finally, in order to demonstrate that the maturation process of glycoproteins and their cell surface expression were not disturbed by the unnatural SiaNAI incorporation into glycoproteins through salvage pathway, we coupled the SiaNAI to biotin-azide through cycloaddition reaction and imaged it in confocal microscopy by FITC-streptavidin. As observed on Figure 8C, an intense fluorescent signal associated to the cells periphery was detected. Comparison of these images with the phase contrast images of the cells (data not shown) established that the fluorescence clearly delineated the cell membrane. Similar observation of cells without preincubation with SiaNAI did not show any signal, which confirmed the specificity of the labeling procedure, as previously demonstrated.³¹

DISCUSSION

The present study reports the first comprehensive profiling of glycans from the major glycoproteins and glycolipids, as well as a screening of the genes coding for putative terminal glycosyltransferases from a zebrafish liver cells. Compared to mammalian cell lines, this cell culture system presents the advantage of being derived from normal, nontransformed and nontumorous cells and thus exhibits closer gene expression pattern and cell cycle profiles to those of cells in the living organism.^{21,23} Structural

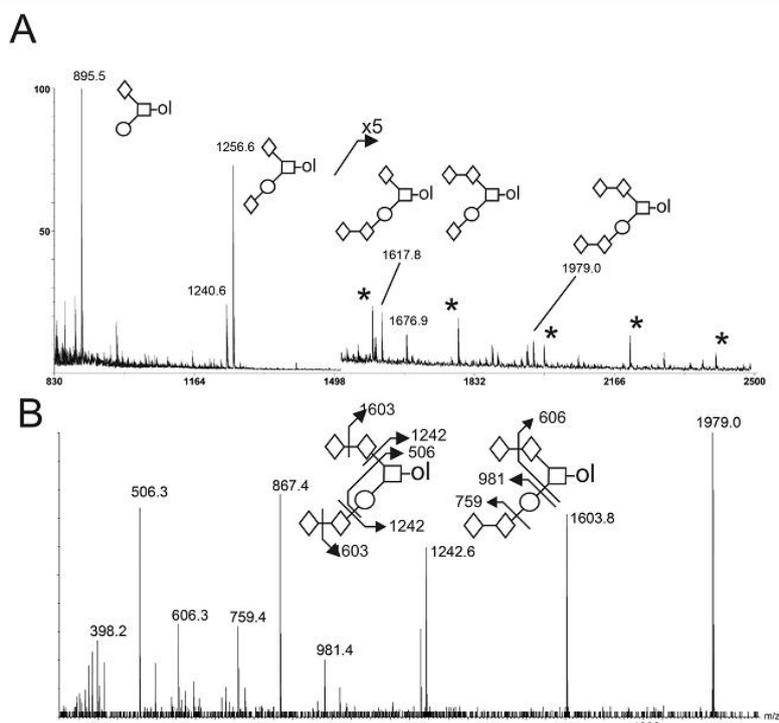


Figure 6. MS profile and MS/MS sequencing of ZFL *O*-glycans. (A) MS profiles of major *O*-glycans are core-1 type structures with 1–4 sialic acids, corresponding to m/z 895, 1256, 1617, and 1979, respectively. (B) MALDI-Q/TOF sequencing of tetrasialylated *O*-glycan (OG4). The major peaks at m/z 1603, 1242, 867, and 506 correspond to the serial loss of sialic acid during CID fragmentation, including 2 terminal (interval 375) and 2 internal sialic acid (interval 361). B ion at m/z 759 and C ion 981 indicates the disialic acid is 3-linked to Gal. Signal at m/z 606 generated by double cleavage suggested that the other disialic acid is linked to GalNAc-itol. * Contaminating high-mannose type *N*-glycans.

Table 3. $^1\text{H-NMR}$ Chemical Shifts of Major *O*-Linked Glycans Analyzed in Mixture^a

residues	protons	OG1	OG2
GalNAc-ol	1	3.775	3.775
	1'	3.745	3.745
	2	4.379 ^s	4.379 ^s
	3	4.056	4.056
	4	3.563	3.563
	5	4.241	4.241
	6	3.855	3.855
Gal	6'	3.563	3.563
	1	4.473 ^{*s}	4.541 ^{*s}
	2	3.578	3.609
	3	3.672	4.116
	4		3.936
	5		3.699
	6		3.832
NeuAc6	6'	3.814	
	H3ax	1.692 ^{*s}	1.692 ^{*s}
NeuAc3	H3eq	2.728	2.728
	H3ax		1.801 ^{*s}
SOACS	H3eq		2.774
		6.165	8.034
SOACS-ol		10.544	12.413

^aCalibration with acetone $\delta^1\text{H} = 2.225$, $\delta^{13}\text{C} = 31.55$. SOACS and SOACS-ol indexes were calculated according to ref 36. *, values used to calculate SOACS; ^s, values used to calculate SOACS-ol.

analysis of glycans showed that all glycoconjugates present a high degree of sialylation. Indeed, all *O*-glycans and complex *N*-glycans, as well as the vast majority of glycolipids were shown to be substituted by one to four sialic acids, in a similar manner to what was observed in total glycome of zebrafish embryos.^{18,19} However, while total glycoconjugates of embryos contain a high proportion of Neu5Gc compared to Neu5Ac (Neu5Gc/Neu5Ac ratio of about 3:1),¹⁹ glycoconjugates from ZFL cells contain a very low amount of Neu5Gc, below 10%. The glycosylation profile of ZFL also showed significant differences compared with developing embryos. In particular, *O*-glycans from ZFL appears to be very simple, based on a core 1 scaffold without further extension and a similar mono- and disialylation pattern. It is in contrast to $\text{Fuc}(\alpha 1,3)\text{GalNAc}(\beta 1,4)(\text{Neu5Ac/Gc})\text{Gal}(\beta 1,3)\text{GalNAc}$ sequences and core 2 polysialylated Lewis x glycans identified in embryos.¹⁸ Interestingly, ZFL cells not only synthesize *N*-glycans that contain the same unusual $\text{Gal}\beta 1-4[\text{Sia}(\alpha 2,3)]\text{Gal}\beta 1-4[\text{Fuc}(\alpha 1,3)]\text{GlcNAc}$ motif already observed in embryo, albeit exclusively sialylated with Neu5Ac, but also contain classical multiantennary sialylated *N*-glycans, with and without core fucosylation, that were not previously observed in embryos. Finally, the glycolipid profile appeared as a mixture of classical gangliosides dominated by GM2 and neutral LacNAc elongated sphingolipids. The analysis of the glycosylation pattern of adult liver showed that the liver glycome was closer to embryos than to ZFL cells (data not shown). In particular, liver tissue synthesized $\text{Gal}\beta 1-4[\text{Sia}(\alpha 2,3)]\text{Gal}\beta 1-4[\text{Fuc}(\alpha 1,3)]\text{GlcNAc}$

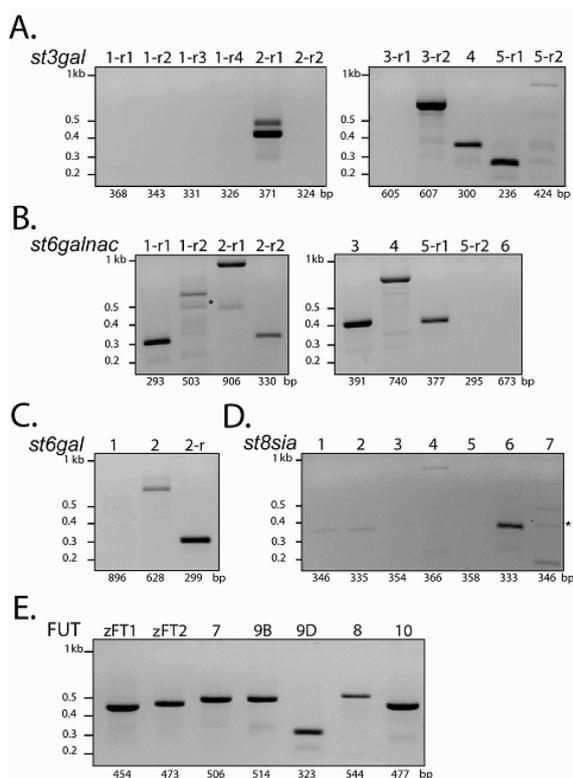


Figure 7. Expression pattern of the zebrafish sialyl- and fucosyltransferase genes in ZFL cells using RT-PCR. Relative expression levels of the zebrafish sialyl- and fucosyltransferase mRNA in ZFL cell were evaluated by RT-PCR. Sialyltransferase and fucosyltransferase zebrafish gene names, oligonucleotide primer sequences and accession numbers specific of each glycosyltransferase are provided in the Supporting Information (Table S1). The nomenclature used for sialyltransferases has been described previously by Tsuji and collaborators and adapted to zebrafish sialyltransferase genes.^{52,53} Indeed, several sialyltransferase-related genes were identified in the screened vertebrate genomes and are designated in this figure as *gene-r1*, *-r2*, *-r3* or *-r4* based on phylogenetic studies.^{46,52} Molecular masses of the expected amplified fragments are indicated below each lane (bp). Molecular weight markers are indicated on the left-hand side of the gel picture (bp). The zebrafish β -actin (378 bp) was amplified as a control of cDNA synthesis and purity (data not shown). * Expected DNA fragment.

substituted *N*-glycans and disialylated core 1 *O*-glycans as found in ZFL, but they exhibited a simpler glycan profile lacking core-fucosylated *N*-glycans and tri/tetra sialylated *O*-glycans. Furthermore, adult liver glycans contained a much higher proportion of Neu5Gc (Neu5Ac/Neu5Gc, 1:1) than ZFL, comparable to embryonic glycoproteins. The differences observed between the glycomes of ZFL cells and liver tissue are not surprising considering that ZFL cells are derived from liver epithelium, and thus may be attributable to a cell-type-dependent glycosylation pattern.

In parallel to the glycomics profiling of ZFL, the expression pattern of all putative terminal glycosyltransferase genes identified in zebrafish genome by RT-PCR showed very specific expression profiles. From a general point of view, the results from gene expressions largely overlap with structural data. Indeed, for ST3Gal

family, high expression of *st3gal2-r1*, one of the zebrafish genes orthologous to the human ST3Gal II, which shows a large preference for *O*-glycans, is totally in agreement with the prevalence of Neu5Ac(α 2,3)Gal motif in *O*-glycans.⁴¹ Similarly, high expression level of the zebrafish genes *st3gal3-r2* and *st3gal4* correlates with the identification of α 2 \rightarrow 3Gal sialylation of LacNAc motifs in all complex *N*-glycans (Table S3, Supporting Information).^{42,43} Among the ST3Gal family members involved in glycolipids sialylation, only the zebrafish *st3gal5-r1* gene, which human ortholog was identified as the GM3 synthase, showed a robust expression in ZFL in agreement with the prevalence of GM2 and GM3 among sialylated glycolipids, whereas the zebrafish *st3gal1-related* genes and *st3gal5-r2* gene, respectively involved in the sialylation of GM1a and GM4,^{44,45} are not expressed. Expression pattern of the zebrafish *st6galnac* genes appears broader than the one of *st3gal* genes, but similarly coherent with glycome. Indeed, all members known to be potentially involved in the sialylation of *O*-glycans are expressed in agreement with the high expression of Neu5Ac(α 2,3)Gal(β 1,3)[Neu5Ac(α 2,6)]GalNAc, whereas the *st6galnac6* gene potentially involved in synthesis of α -series ganglioside, is not expressed (Table S3).⁴⁶ Among all sialyltransferases, the ST8Sia family exhibited the most restricted expression pattern in ZFL, the zebrafish *st8sia6* gene being the only member intensely expressed, whereas all six *st8sia* genes (*st8sia1* to *st8sia6*) were clearly observed in developing embryo.⁵ Again, robust expression of ST8Sia VI, described as transferring a single sialic acid residue to sialylated *O*-glycans both in human and mice,^{47,48} is correlated with the observation of *O*-glycans presenting one or two disialylated motifs. Although the general expression profile of glycosyltransferase genes fits well with the observed glycan structures, the differential expression profiles of duplicated sialyltransferase genes cannot be easily explained. It is not yet possible to establish if the respective products of duplicated genes presenting extremely high sequence homologies exhibit similar activities that are differently regulated, or if only one out of the two is expressed in a given cell type or organ.

Compared with sialyltransferases, all putative α 1,3 and α 1,6 fucosyltransferase genes identified in zebrafish genome -*zFT1*, *zFT2*, *FUT7*, *FUT9B*, *FUT9D*, *FUT10* and *Fut8* were shown to be expressed in ZFL.⁴⁹⁻⁵¹ The expression of five different genes coding for Lewis-type α 1 \rightarrow 3 fucosyltransferases does not seem to correlate with a clear structural pattern in ZFL cells and we cannot yet directly establish which enzyme(s), if not all, may be involved into the synthesis of the Gal β 1-4[Sia(α 2,3)]Gal β 1-4[Fuc(α 1,3)]GlcNAc motif identified on *N*-glycans. In the developing embryo, the expression pattern of *zFT1* nicely fits with the appearance of Lewis x containing free *N*-glycans, which strongly suggests that this enzyme is directly involved in the synthesis of these molecules.²⁰

Altogether, the ZFL cell line appears as an attractive model system for studying functions of glycosyltransferases and glycoconjugates in zebrafish and in the vertebrate lineage. From a general point of view, zebrafish cell lines present all the advantages of vertebrate cell systems but keep the features of normal tissues, as pointed out above.^{21,23} From a glycobiochemical point of view, the present study showed that ZFL cells express a quite simple panel of typical vertebrate glycans. Furthermore, we demonstrated that its glycans are amenable to advanced metabolic labeling using sialic acids analogs. We expect that the provided data will open new perspectives for the development of ZFL as a new platform for the study of glycosylation.

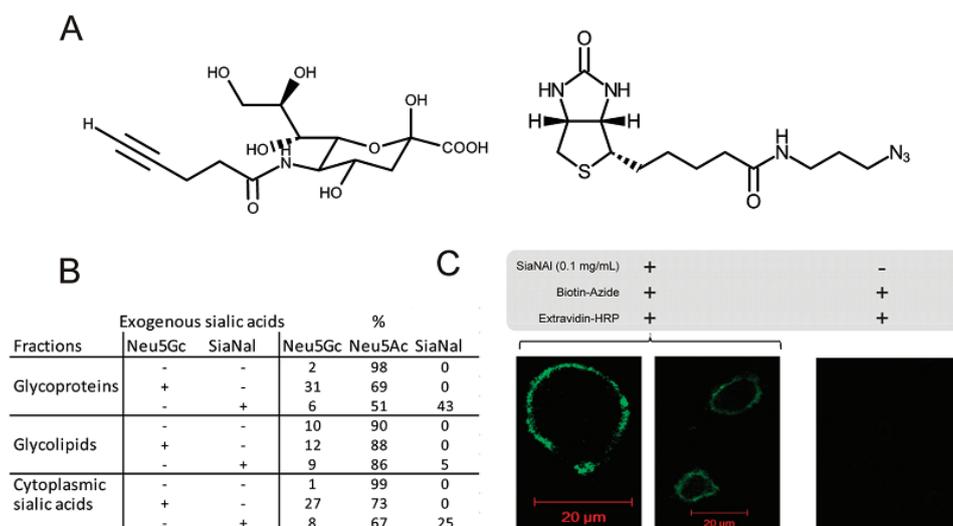


Figure 8. Metabolic labeling of sialylated glycoconjugates by unnatural sialic acids. (A) Alkyne-terminated sialic acid and biotin azide were synthesized and used to probe the metabolic labeling of glycoconjugates. Structural analyses of synthesized molecules are presented in Figure S1 and S2 (Supporting Information). (B) Incorporation efficiency of unnatural exogenous alkyne-terminated sialic acids and natural Neu5Gc was established by HPLC. (C) Observation of cell surface localization of labeled sialylated glycoconjugates by confocal microscopy.

■ ASSOCIATED CONTENT

📄 Supporting Information

Figure S1, Structural analysis of synthetic SiaNAI; Figure S2, structural analysis of synthetic biotin azide; Figure S3, MALDI TOF/TOF analysis of permethylated glycans from GL9 and GL15; Figure S4, profiles of *N*-glycans treated by exoglycosidases; Figure S5, MS/MS fragmentation of β -1,4-galactosidase resistant *N*-glycans; Table S1, summary of primer nucleotide sequences; Table S2, summary of *N*-glycans digested by exoglycosidases; Tables S3, cloned glycosyltransferases in zebrafish; Supplementary references. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Yann Guérardel, Tel: (+33) 3 20 43 69 41. E-mail: yann.guerardel@univ-lille1.fr.

Author Contributions

[§]These authors contributed equally to this study

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

This study was funded by CNRS and JST in the context of a Strategic Japanese-French Cooperative Program on “Marine Genome and Marine Biotechnology” and by the ANR (ANR blanche Galfish). The 900 MHz spectrometer was funded by Région Nord-Pas de Calais, European Union (FEDER), Ministère Français de la Recherche, Université Lille1-Sciences et Technologies and CNRS. Financial support from the TGE RMN THC Fr3050 for conducting the research on the 900 MHz spectrometer is gratefully acknowledged. The MALDI-MS data were acquired at the Core Facilities for Protein Structural Analysis at Academia Sinica, supported under the Taiwan National Core Facility Program for Biotechnology, NSC grant 100-2325-B-001-029 and

at the Mass Spectrometry facility of Université Lille1 supported by the European community (FEDER), the Région Nord-Pas de Calais (France), the IBISA network, the CNRS and the Université Lille 1. We thank Anne Marie Mir and Lucie Ducrocq for their excellent technical assistance.

■ REFERENCES

- (1) Webster, D. M.; Teo, C. F.; Sun, Y.; Wloga, D.; Gay, S.; Klonowski, K. D.; Wells, L.; Dougan, S. T. O-GlcNAc modifications regulate cell survival and epiboly during zebrafish development. *BMC Dev. Biol.* **2009**, *9*, 28.
- (2) Avsar-Ban, E.; Ishikawa, H.; Many, H.; Watanabe, M.; Akiyama, S.; Miyake, H.; Endo, T.; Tamaru, Y. Protein O-mannosylation is necessary for normal embryonic development in zebrafish. *Glycobiology* **2010**, *20*, 1089–1102.
- (3) Marx, M.; Rutishauser, U.; Bastmeyer, M. Dual function of polysialic acid during zebrafish central nervous system development. *Development* **2001**, *128*, 4949–4958.
- (4) Bentrop, J.; Marx, M.; Schattschneider, S.; Rivera-Milla, E.; Bastmeyer, M. Molecular evolution and expression of zebrafish St8SiaIII, an α -2,8-sialyltransferase involved in myotome development. *Dev. Dyn.* **2008**, *237*, 808–818.
- (5) Chang, L.-Y.; Mir, A.-M.; Thisse, C.; Guérardel, Y.; Delannoy, P.; Thisse, B.; Harduin-Lepers, A. Molecular cloning and characterization of the expression pattern of the zebrafish α 2, 8-sialyltransferases (ST8Sia) in the developing nervous system. *Glycoconj. J.* **2008**, *26*, 263–275.
- (6) Kustermann, S.; Hildebrandt, H.; Bolz, S.; Dengler, K.; Kohler, K. Genesis of rods in the zebrafish retina occurs in a microenvironment provided by polysialic acid-expressing Müller glia. *J. Comp. Neurol* **2010**, *518*, 636–646.
- (7) Rieger, S.; Volkmann, K.; Köster, R. W. Polysialyltransferase expression is linked to neuronal migration in the developing and adult zebrafish. *Dev. Dyn.* **2008**, *237*, 276–285.
- (8) Seth, A.; Machingo, Q. J.; Fritz, A.; Shur, B. D. Core fucosylation is required for midline patterning during zebrafish development. *Dev. Dyn.* **2010**, *239*, 3380–3390.
- (9) Machingo, Q. J.; Fritz, A.; Shur, B. D. A β 1,4-galactosyltransferase is required for Bmp2-dependent patterning of the dorsoventral axis during zebrafish embryogenesis. *Development* **2006**, *133*, 2233–2241.

- (10) Machingo, Q. J.; Fritz, A.; Shur, B. D. A β 1,4-galactosyltransferase is required for convergent extension movements in zebrafish. *Dev. Biol.* **2006**, *297*, 471–482.
- (11) Thornhill, P.; Bassett, D.; Lochmüller, H.; Bushby, K.; Straub, V. Developmental defects in a zebrafish model for muscular dystrophies associated with the loss of fukutin-related protein (FKRP). *Brain* **2008**, *131*, 1551–1561.
- (12) Kawahara, G.; Guyon, J. R.; Nakamura, Y.; Kunkel, L. M. Zebrafish models for human FKRP muscular dystrophies. *Hum. Mol. Genet.* **2009**, *19*, 623–633.
- (13) Lin, Y.-Y.; White, R. J.; Torelli, S.; Cirak, S.; Muntoni, F.; Stemple, D. L. Zebrafish Fukutin family proteins link the unfolded protein response with dystroglycanopathies. *Hum. Mol. Genet.* **2011**, *20*, 1763–1775.
- (14) Muntoni, F.; Torelli, S.; Wells, D. J.; Brown, S. C. Muscular dystrophies due to glycosylation defects: diagnosis and therapeutic strategies. *Curr. Opin. Neurol.* **2011**, *24*, 437–442.
- (15) Wiweger, M. I.; Avramut, C. M.; de Andrea, C. E.; Prins, F. A.; Koster, A. J.; Ravelli, R. B.; Hogendoorn, P. C. Cartilage ultrastructure in proteoglycan-deficient zebrafish mutants brings to light new candidate genes for human skeletal disorders. *J. Pathol.* **2011**, *223*, 531–542.
- (16) Senderek, J.; Müller, J. S.; Dusch, M.; Strom, T. M.; Guergueltcheva, V.; Diepolder, I.; Laval, S. H.; Maxwell, S.; Cossins, J.; Krause, S.; Muelas, N.; Vilchez, J. J.; Colomer, J.; Mallebrera, C. J.; Nascimento, A.; Nafissi, S.; Kariminejad, A.; Nilipour, Y.; Bozorgmehr, B.; Najmabadi, H.; Rodolico, C.; Sieb, J. P.; Steinlein, O. K.; Schlotter, B.; Schoser, B.; Kirschner, J.; Herrmann, R.; Voit, T.; Oldfors, A.; Lindbergh, C.; Urtizberea, A.; von der Hagen, M.; Hübner, A.; Palace, J.; Bushby, K.; Straub, V.; Beeson, D.; Abicht, A.; Lochmüller, H. Hexosamine Biosynthetic Pathway Mutations Cause Neuromuscular Transmission Defect. *Am. J. Hum. Genet.* **2011**, *88*, 162–172.
- (17) Takemoto, T.; Natsuka, S.; Nakakita, S.-I.; Hase, S. Expression of complex-type N-glycans in developmental periods of zebrafish embryo. *Glycoconj. J.* **2005**, *22*, 21–26.
- (18) Guérardel, Y.; Chang, L.-Y.; Maes, E.; Huang, C.-J.; Khoo, K.-H. Glycomic survey mapping of zebrafish identifies unique sialylation pattern. *Glycobiology* **2006**, *16*, 244–257.
- (19) Chang, L.-Y.; Harduin-Lepers, A.; Kitajima, K.; Sato, C.; Huang, C.-J.; Khoo, K.-H.; Guérardel, Y. Developmental regulation of oligosialylation in zebrafish. *Glycoconj. J.* **2009**, *26*, 247–261.
- (20) Moriguchi, K.; Takemoto, T.; Aoki, T.; Nakakita, S.-I.; Natsuka, S.; Hase, S. Free oligosaccharides with Lewis x structure expressed in the segmentation period of zebrafish embryo. *J. Biochem.* **2007**, *142*, 213–227.
- (21) He, S.; Salas-Vidal, E.; Rueb, S.; Krens, S. F. G.; Meijer, A. H.; Snaar-Jagalska, B. E.; Spaik, H. P. Genetic and Transcriptome Characterization of Model Zebrafish Cell Lines. *Zebrafish* **2006**, *3*, 441–453.
- (22) He, S.; Krens, S. G.; Zhan, H.; Gong, Z.; Hogendoorn, P. C.; Spaik, H. P.; Snaar-Jagalska, B. E. A Δ Raf1-ER-inducible oncogenic zebrafish liver cell model identifies hepatocellular carcinoma signatures. *J. Pathol.* **2011**, *225*, 19–28.
- (23) Ghosh, C.; Zhou, Y. L.; Collodi, P. Derivation and characterization of a zebrafish liver cell line. *Cell Biol. Toxicol.* **1994**, *10*, 167–176.
- (24) Bopp, S. K.; Lettieri, T. Comparison of four different colorimetric and fluorometric cytotoxicity assays in a zebrafish liver cell line. *BMC Pharmacol.* **2008**, *8*, 8.
- (25) Chen, D.; Zhang, D.; Yu, J. C.; Chan, K. M. Effects of Cu(2)O nanoparticle and CuCl(2) on zebrafish larvae and a liver cell-line. *Aquat. Toxicol.* **2011**, *105*, 344–354.
- (26) Reschly, E. J.; Ai, N.; Welsh, W. J.; Ekins, S.; Hagey, L. R.; Krasowski, M. D. Ligand specificity and evolution of liver X receptors. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2008**, *110*, 83–94.
- (27) Kanther, M.; Sun, X.; Mühlbauer, M.; Mackey, L. C.; Flynn, E. J.; Bagnat, M.; Jobin, C.; Rawls, J. F. Microbial Colonization Induces Dynamic Temporal and Spatial Patterns of NF- κ B Activation in the Zebrafish Digestive Tract. *Gastroenterology* **2011**, *141*, 197–207.
- (28) Go, S.; Sato, C.; Furuhashi, K.; Kitajima, K. Oral ingestion of mannose alters the expression level of deaminoneuraminic acid (KDN) in mouse organs. *Glycoconj. J.* **2006**, *23*, 411–421.
- (29) Ciucanu, I.; Kerek, F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydr. Res.* **1984**, *131*, 209–217.
- (30) Chang, P. V.; Chen, X.; Smyrniotis, C.; Xenakis, A.; Hu, T.; Bertozzi, C. R.; Wu, P. Metabolic Labeling of Sialic Acids in Living Animals with Alkynyl Sugars. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 4030–4033.
- (31) Hsu, T.-L.; Hanson, S. R.; Kishikawa, K.; Wang, S.-K.; Sawa, M.; Wong, C.-H. Alkynyl sugar analogs for the labeling and visualization of glycoconjugates in cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, *104*, 2614–2619.
- (32) Hara, S.; Takemori, Y.; Yamaguchi, M.; Nakamura, M.; Ohkura, Y. Fluorometric high-performance liquid chromatography of N-acetyl- and N-glycolylneuraminic acids and its application to their micro-determination in human and animal sera, glycoproteins, and glycolipids. *Anal. Biochem.* **1987**, *164*, 138–145.
- (33) Sato, C.; Inoue, S.; Matsuda, T.; Kitajima, K. Development of a highly sensitive chemical method for detecting α 2 \rightarrow 8-linked oligo/polysialic acid residues in glycoproteins blotted on the membrane. *Anal. Biochem.* **1998**, *261*, 191–197.
- (34) Yu, S.-Y.; Wu, S.-W.; Khoo, K.-H. Distinctive characteristics of MALDI-Q/TOF and TOF/TOF tandem mass spectrometry for sequencing of permethylated complex type N-glycans. *Glycoconj. J.* **2006**, *23*, 355–369.
- (35) Kamerling, J. P.; Vliegthart, J. F. G. High-resolution proton-nuclear magnetic resonance spectroscopy of oligosaccharide-alditols released from mucin-type O-glycoproteins. *Biol. Magn. Res.* **1992**, *10*, 1–288.
- (36) Maes, E.; Bonachera, F.; Strecker, G.; Guérardel, Y. SOACS index: an easy NMR-based query for glycan retrieval. *Carbohydr. Res.* **2009**, *344*, 322–330.
- (37) Hsu, T.-L.; Hanson, S. R.; Kishikawa, K.; Wang, S.-K.; Sawa, M.; Wong, C.-H. Alkynyl sugar analogs for the labeling and visualization of glycoconjugates in cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, *104*, 2614–2619.
- (38) Laughlin, S. T.; Bertozzi, C. R. Metabolic labeling of glycans with azido sugars and subsequent glycan-profiling and visualization via Staudinger ligation. *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 2930–2944.
- (39) Luchansky, S. J.; Argade, S.; Hayes, B. K.; Bertozzi, C. R. Metabolic functionalization of recombinant glycoproteins. *Biochemistry* **2004**, *43*, 12358–12366.
- (40) Lepers, A.; Shaw, L.; Schneckeburger, P.; Cacan, R.; Verbert, A.; Schauer, R. A study on the regulation of N-glycolylneuraminic acid biosynthesis and utilization in rat and mouse liver. *Eur. J. Biochem.* **1990**, *193*, 715–723.
- (41) Giordanengo, V.; Bannwarth, S.; Laffont, C.; Van Miegem, V.; Harduin-Lepers, A.; Delannoy, P.; Lefebvre, J. C. Cloning and expression of cDNA for a human Gal(β 1–3)GalNAc α 2,3-sialyltransferase from the CEM T-cell line. *Eur. J. Biochem.* **1997**, *247*, 558–566.
- (42) Kitagawa, H.; Paulson, J. C. Cloning and expression of human Ga I β 1,3(4)GlcNAc α 2,3-sialyltransferase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1993**, *194*, 375–382.
- (43) Kitagawa, H.; Paulson, J. C. Cloning of a novel α 2,3-sialyltransferase that sialylates glycoprotein and glycolipid carbohydrate groups. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 1394–1401.
- (44) Lee, Y. C.; Kurosawa, N.; Hamamoto, T.; Nakaoka, T.; Tsuji, S. Molecular cloning and expression of Gal β 1,3GalNAc α 2,3-sialyltransferase from mouse brain. *Eur. J. Biochem.* **1993**, *216*, 377–385.
- (45) Chisada, S.-i.; Yoshimura, Y.; Sakaguchi, K.; Uemura, S.; Go, S.; Ikeda, K.; Uchima, H.; Matsunaga, N.; Ogura, K.; Tai, T.; Okino, N.; Taguchi, R.; Inokuchi, J.; Ito, M. Zebrafish and Mouse 2,3-Sialyltransferases Responsible for Synthesizing GM4 Ganglioside. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 30534–30546.

- (46) Harduin-Lepers, A.; Mollicone, R.; Delannoy, P.; Oriol, R. The animal sialyltransferases and sialyltransferase-related genes: a phylogenetic approach. *Glycobiology* **2005**, *15*, 805–817.
- (47) Takashima, S.; Ishida, H.-K.; Inazu, T.; Ando, T.; Ishida, H.; Kiso, M.; Tsuji, S.; Tsujimoto, M. Molecular cloning and expression of a sixth type of α 2,8-sialyltransferase (ST8Sia VI) that sialylates O-glycans. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 24030–24038.
- (48) Teinturier-Lelièvre, M.; Julien, S.; Juliant, S.; Guerardel, Y.; Duonor-Cérutti, M.; Delannoy, P.; Harduin-Lepers, A. Molecular cloning and expression of a human hST8Sia VI (α 2,8-sialyltransferase) responsible for the synthesis of the diSia motif on O-glycosylproteins. *Biochem. J.* **2005**, *392*, 665–674.
- (49) Kageyama, N.; Natsuka, S.; Hase, S. Molecular cloning and characterization of two zebrafish α (1,3)fucosyltransferase genes developmentally regulated in embryogenesis. *J. Biochem.* **1999**, *125*, 838–845.
- (50) Mollicone, R.; Moore, S. E. H.; Bovin, N.; Garcia-Rosasco, M.; Candelier, J.-J.; Martinez-Duncker, I.; Oriol, R. Activity, splice variants, conserved peptide motifs, and phylogeny of two new α 1,3-fucosyltransferase families (FUT10 and FUT11). *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 4723–4738.
- (51) Petit, D.; Maftah, A.; Julien, R.; Petit, J.-M. En Bloc Duplications, Mutation Rates, and Densities of Amino Acid Changes Clarify the Evolution of Vertebrate α -1,3/4-Fucosyltransferases. *J. Mol. Evol.* **2006**, *63*, 353–364.
- (52) Harduin-Lepers Comprehensive Analysis of Sialyltransferases in Vertebrate Genomes. *Glycobiology Insights* **2010**, *29*, doi: 10.4137/GBLS3123.
- (53) Tsuji, S.; Datta, A. K.; Paulson, J. C. Systematic nomenclature for sialyltransferases. *Glycobiology* **1996**, *6*, v–vii.

Informations supplémentaires :

Mapping the expressed glycome and glycosyltransferases of zebrafish liver cells as a relevant model system for glycosylation studies.

Jorick Vanbeselaere^{1,2,§}; Lan-Yi Chang^{3,§}; Anne Harduin-Lepers^{1,2}; Emeline Fabre^{1,2}; Nao Yamakawa^{1,2}; Christian Slomianny⁴; Christophe Biot^{1,2}; Kay-Hooi Khoo³ and Yann Guerardel^{1,2,}*

¹Université Lille Nord de France, Université Lille 1, Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UGSF, F-59650 Villeneuve d'Ascq, France; ²CNRS, UMR 8576, F-59650 Villeneuve d'Ascq, France ; ³Institute of Biological Chemistry, Academia Sinica, Taipei 115, Taiwan ; ⁴INSERM-LPC, U1003, Université Lille1, Cité Scientifique, Bât. SN3, F-59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

[§]Authors equally contributed to the study

*Corresponding authors: Yann Guérardel; Tel: (+33) 3 20 43 69 41, e-mail:

yann.guerardel@univ-lille1.fr

Supporting information

Figure S3. MALDI TOF/TOF analysis of permethylated glycans from GSL. MALDI-TOF/TOF analysis of the glycan moieties of (A) GL9 (nLcGg₅Cer) and (B) GL15 (nLcGg₇Cer).

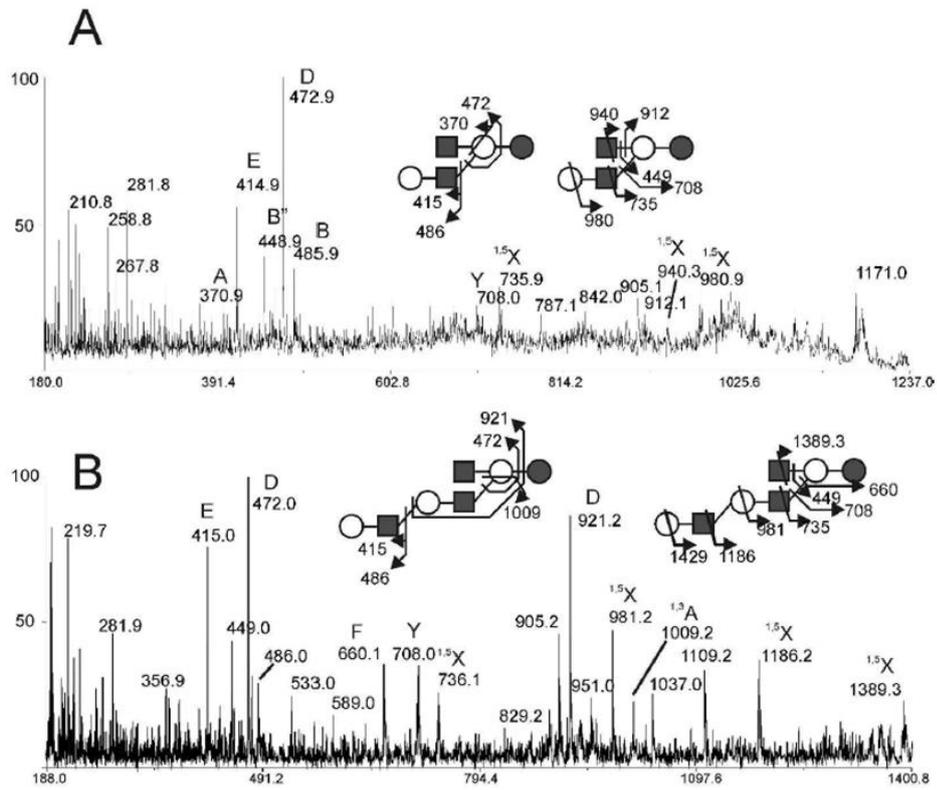


Figure S4. MALDI-MS profile of permethylated *N*-glycans from ZFL cells after exoglycosidase treatments. *N*-glycans were analyzed (A) prior to enzymatic digestion, (B) following sialidase digestion and (C) following sialidase and β -1,4-galactosidase digestions.

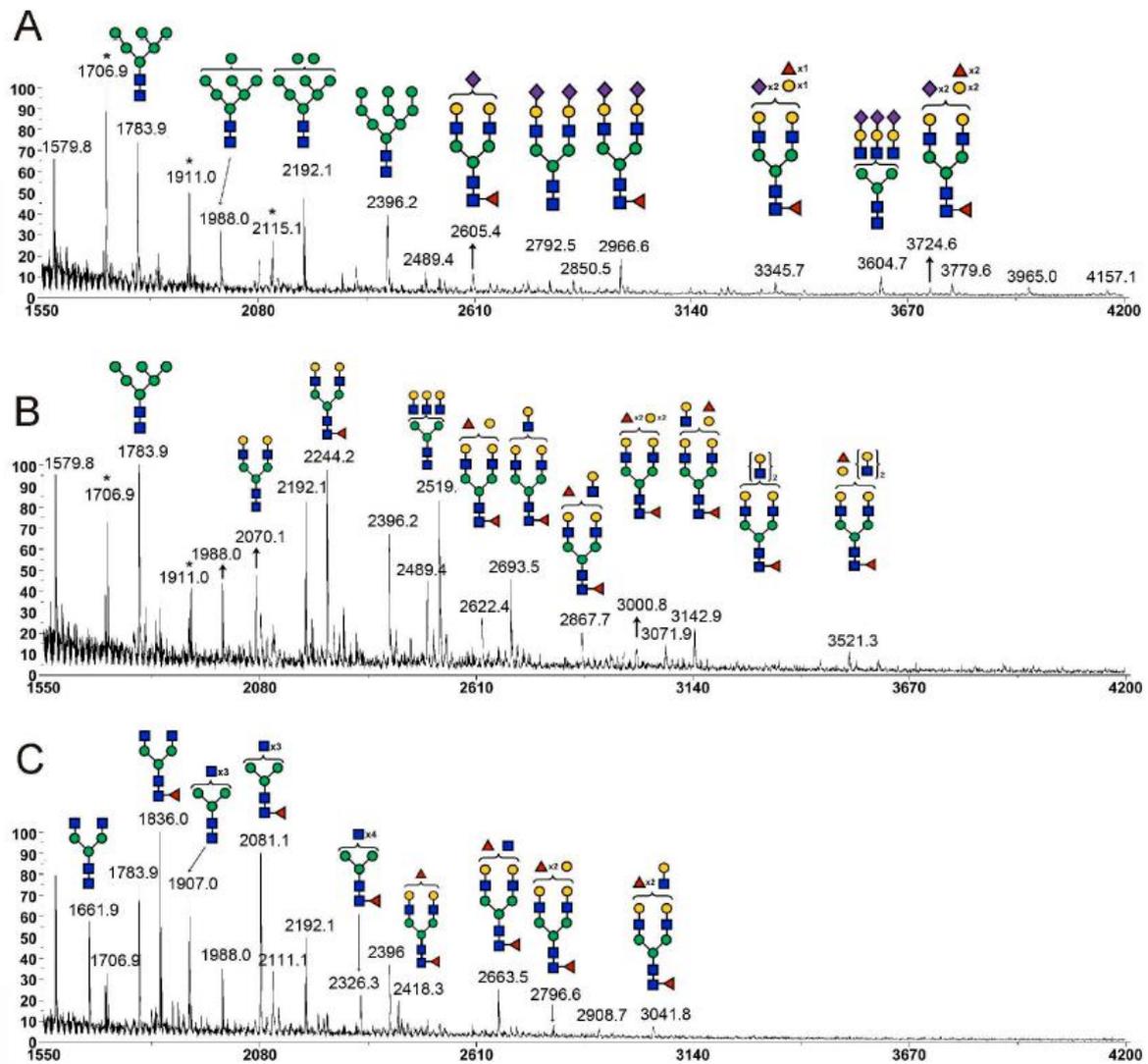


Figure S5. MALDI-MS/MS sequencing of biantennary complex-type *N*-glycans isolated from ZFL cells. Components were sequentially digested by sialidase and β -1,4-galactosidase prior to permethylation. As demonstrated by the MS/MS fragmentation pattern, the terminal Hex-Hex motifs associated to these glycans were partially resistant to galactosidase digestion.

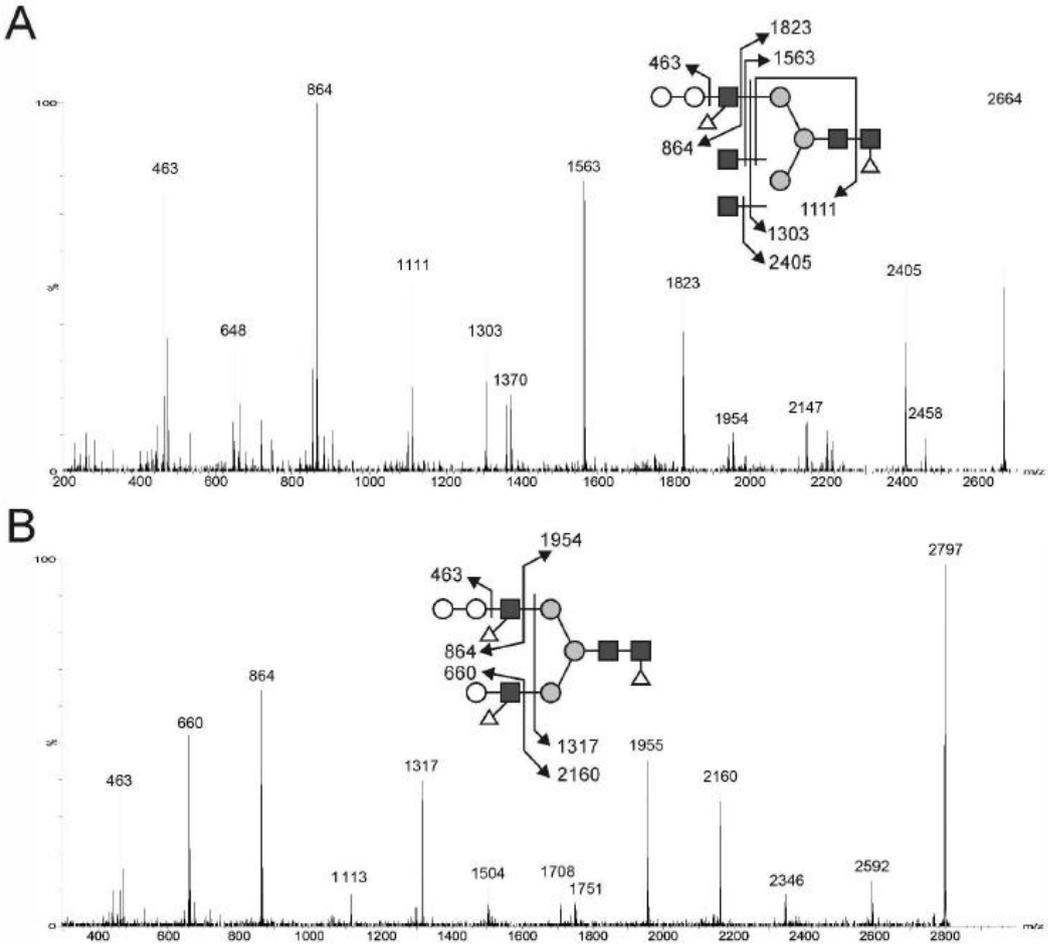


Table S1: Oligonucleotide sequences, annealing temperatures and expected amplicon size used in PCR. Accession numbers in GenBank for the identified zebrafish sialyltransferases and fucosyltransferases are indicated. References for the use of these oligonucleotide primer sets are indicated in the last column.

Zebrafish glycosyltransferases	GenBank accession number of ZF genes	Primer sequence		Annealing temp. (°C)	PCR product size (bp)	Ref.
		Forward	Reverse			
Actine	AF025305	5'-GTTGGTATGGGACAGAAAGA	5'-GGCGTAACCCTCGTAGAT	52°	378	¹
<i>st3gal1-r1</i>	AJ864512	5'-CTCTGGGAACATCTTGGG	5'-CGGTTGATGGGTAAGTGC	58	368	
<i>st3gal1-r2</i>	AJ864513	5'-CAGATGCTGGTCCAGATC	5'-ATCACCTTGTCCTGTCT	52	343	
<i>st3gal1-r3</i>	AM287261	5'-AAGGACAGCGACTACAGA	5'-TGAAGGAACTAATGAGCC	58	331	
<i>st3gal1-r4</i>	AM287262	5'-CCGTATGATCTACCCTGAG	5'-TCCATCTTATCTGCTCC	50/52	326	
<i>st3gal2-r1</i>	AJ783741	5'-GGTGGACAGAGCGTCATG	5'-GTCAATTAACGGCAGGGTG	58	371	
<i>st3gal2-r2</i>	AJ783740	5'-CCCCTGTAGGGTATGAA	5'-TACGTGTAGAGCGAAGAA	50/52	324	
<i>st3gal3-r1</i>	AJ626821	5'-GCAATGGCGGTATCCTTA	5'-GGCCTTCACCAACTTTCG	50	605	
<i>st3gal3-r2</i>	AJ626820	5'-AACCTAAGTAAAGGCGAGTG	5'-ACGAGGCTTCCTGTATGA	52	607	
<i>st3gal4</i>	AJ744809	5'-AGAGGGTCAGTAAGGGTTT	5'-GATTCAGATCGTGGTAGGA	52	300	
<i>st3gal5-r1</i>	AJ619960	5'-TGGCTGTGATATTCAAGTC	5'-TGTAGGGATGTTCTGGTC	52	236	²
<i>st3gal5-r2</i>	AJ783742	5'-TCCCACATACAGGAATACG	5'-CAGTCTCGGCACTAACATC	52	424	²
<i>st6gal1</i>	AJ744801	5'-TTCGGGATGCTGATGTTT	5'-ATAGAGTAATGGGTGGTAGG	50	896	³
<i>st6gal2</i>	AJ627627	5'-GGGTGGTGATGAAGGTAGA	5'-GTGCAGGTTGAGGGTGTA	56	628	³
<i>st6gal2-r</i>	FN550105	5'-CTCAACCTACTCTCAGCAT		52	299	³

		5'-TCGCTGCAGTTTTGCACT			
<i>st6galnac1-r1</i>	AJ705079	5'-GGAGGATGTTCGGAAACAGAA 5'-TGTTGCGAATGTAACGAAGG	51	503	
<i>st6galnac1-r2</i>	HE590885	5'-GCCAGTTGCTGCAAGTACACCCA 5'-TCTGACCACCCACCACCGCT	51	906	
<i>st6galnac2-r1</i>	AJ634459	5'-AACTCAGTCCAGCAATCA 5'-TGTAGACGGCCTGTAAATT	56	330	
<i>st6galnac2-r2</i>	FN550107	5'-GATCTGCTTACACATCCG 5'-CACATAGTCTCGTGCTTC	51	391	
<i>st6galnac3</i>	AJ620947	5'-CACAAAGCCTCCAAACCT 5'-TGCGAGCCTGTGGGTAAT	51	740	
<i>st6galnac4</i>	AJ868430	5'-CCAGGGATATGTGAGGATT 5'-ACGGAGGATAAACGAAGC	51	377	
<i>st6galnac5-r1</i>	AJ646874	5'-GCCAGGACACTTTCTTTAT 5'-CTGCTCATGGGTGACATA	58	295	
<i>st6galnac5-r2</i>	AM287260	5'-CAGCGTCATGGAGTTGCC 5'-CGCACTCTGCCTGATCGA	58	673	
<i>st6galnac6</i>	AJ646883	5'-AAGCAACTTCCGTCAAATC 5'-GCACTCGTCTGGACCTCT	51	503	
<i>st8sia1</i>	AJ715535	5'-TTGCGGTTACTAAGGAGA 5'-ACGAAAGATTTGCGGGAC	52	345	¹
<i>st8sia2</i>	AY055462	5'-GACTCGCACGACTTTGTT 5'-TGGTTGGTCAGCCAGTAA	52	335	¹
<i>st8sia3</i>	AJ715543	5'-GGTTCGGGTGGTCAGTGTT 5'-CGCTGTTCTTGGTCAGGGT	58	341	-
<i>st8sia4</i>	AJ715545	5'-TCTTGACTTGGGAGTTGG 5'-TCTGACCGCAATCCTACA	52	366	¹
<i>st8sia5</i>	AJ715546	5'-TGGCAAGAACTACATCAA 5'-AAAGTCAGAAGCGTCAAT	52	358	-
<i>st8sia6</i>	AJ715551	5'-TGTCTATGATGGCGAAAG 5'-TGACCGTATGAATGAAGG	52	333	¹
<i>st8sia7</i>	AM287257	5'-TTTCCTGGTGGTCCTGAT 5'-GGTGCCTACTGTTGGTT	52	345	¹
<i>zFT1</i>	AB023627	5'-CGGATTTGCCGCAACCCCT 5'-ACAGGAACCGTACCGAGCGC	51	454	
<i>zFT2</i>	AB023628	5'-ACGCCTCTATAATGCGTTGCCA 5'-TGTGCGCTTGTGGTGCCCTT	51	473	
<i>Fut7</i>	AY788991	5'-ATTGGCCATTCGGCATGCGC	51	506	

		5'- TGGGAGCAGCGCCTCTTTCG			
Fut8	AJ781407	5'-AGGTGGAGAATGGTGTGAGG 5'-GGGTGAAGACTGTCCACGAT	51	544	4
Fut9B	AY817666	5'-TCGCCTCGTCCTCCGTTCCA 5'-CCTCCACATGAATAAAGGCGTCTCC	51	514	
Fut9D	AY817665	5'-CCTGTTCTTCTTCTCTGGTTCTGGC 5'-TTCAAGCGCAGCCGGACAGT	51	323	
Fut10	AJ879586	5'- CGCCACTCTCATCTGCCGCT 5'- GAGCTTCTTCGGCGGCTCGT	51	477	

Table S2. Summary of *N*-glycans structures released from ZFLs, identified as permethylated derivatives. Components were identified as intact *N*-glycans or after digestion by sialidase (SiaAse) or sialidase and β -1,4-galactosidase (GalAse).

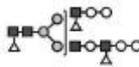
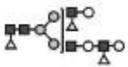
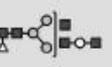
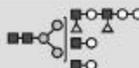
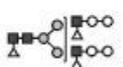
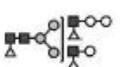
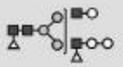
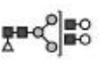
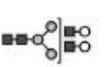
Intact	SiaAse	SiaAse +GalAse	Intact	SiaAse	SiaAse +GalAse
n.d.	 3451	 3041	 3779	 2693	 2081
n.d.	 3451	 3041	 2850	 2489	 2285
n.d.	 3521	 2908	 3965	 2519	 1907
 3725	 3000	 2796	 3604	 2519	 1907
 3345	 2623	 2419	 2605	 2244	 1836
 4157	 3071	 2663	 2966	 2244	 1836
n.d.	 3142	 2326	 2792	 2070	 1661

Table S3. Cloned zebrafish sialyltransferase and fucosyltransferase genes and corresponding enzymatic activities of the mammalian proteins. Gene symbol (HUGO) adopted for zebrafish sialyltransferases is described in Harduin-Lepers *et al.* 2010 glycobiology insights. (-) identified in this study. ZF: zebrafish. References for enzymatic activity of mammalian sialyltransferases are indicated in the last column.

glycosyltransferase	Orthologue(s) zebrafish genes	Other name(s)	Substrate	Structures formed in human tissues	Ref.
ST3Gal I	<i>st3gal1-r1</i> <i>st3gal1-r2</i> <i>st3gal1-r3</i> <i>st3gal1-r4</i>	ST3O, ST3GalA.1	O-GP GL	NeuAc α 2-3Gal β 1-3GalNAc- G _{D1a} G _{M1b} G _{T1b}	5
ST3Gal II	<i>st3gal2-r1</i> <i>st3gal2-r2</i>	ST3GalA.2	O-GP and GL	NeuAc α 2-3Gal β 1-3GalNAc- G _{D1a} G _{M1b} G _{T1b}	6
ST3Gal III	<i>st3gal3-r1</i> <i>st3gal3-r2</i>	ST3(N)	GP	NeuAc α 2-3Gal β 1-3/4GlcNAc-	7
ST3Gal IV	<i>st3gal4</i>	STZ	GP/GL	NeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc- NeuAc α 2-3Gal β 1-3GalNAc-	8
ST3Gal V	<i>st3gal5-r1</i> <i>st3gal5-r2</i>	G _{M3} synthase G _{M4} synthase	GL	NeuAc α 2-3Gal β 1-4Glc β -Cer NeuAc α 2-3Gal β 1-Cer	9,10
ST3Gal VI	Lost in ZF		GP/GL	NeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc-	
ST6Gal I	<i>st6gal1</i>	ST6(N)	N-GP	NeuAc α 2-6Gal β 1-4GlcNAc-	
ST6Gal II	<i>st6gal2</i>		N-GP	NeuAc α 2-6Gal(NAc) β 1-4GlcNAc-	
	<i>st6gal2-r</i>		?	?	
ST6GalNAc I	<i>st6galnac1-r1</i> <i>st6galnac1-r2</i>		O-GP ?	(NeuAc α 2-3) _{0,1} (Gal β 1-3) _{0,1} GalNAc-Ser NeuAc α 2-6'	11 -
ST6GalNAc II	<i>st6galnac2-r1</i> <i>st6galnac2-r2</i>		O-GP ?	(NeuAc α 2-3) _{0,1} Gal β 1-3GalNAc-Ser NeuAc α 2-6'	12 -
ST6GalNAc III	<i>st6galnac3</i>		O-GP and	NeuAc α 2-3Gal β 1-3GalNAc-Ser NeuAc α 2-6'	13

			GL	G _{D1α}	
ST6GalNAc IV	<i>st6galnac4</i>		O-GP and GL	NeuAcα2-3Galβ1-3GalNAc-Ser NeuAcα2-6' G _{D1α}	14
ST6GalNAc V	<i>st6galnac5-r1</i> <i>st6galnac5-r2</i>	G _{D1α} synthase	GP and GL	NeuAcα2-3Galβ1-4GlcNAc- NeuAcα2-6' G _{D1α}	13
ST6GalNAc VI	<i>st6galnac6</i>	G _{D1α} synthase/G _{T1aα} /G _{Q1ba} synthase	GL	α-series gangliosides (G _{D1α} , G _{T1aα} , G _{Q1ba}) and di-sialyl Lewis ^x	13
ST8Sia I	<i>st8sia1</i>	G _{D3} synthase - SAT-II	GL	(NeuAcα2-8) _{1,2} NeuAcα2-3Galβ1-4Glc-Cer G _{D3} and G _{T3}	15,16
ST8Sia II	<i>st8sia2</i>	STX	GP	(NeuAcα2-8) _n NeuAcα2-3Galβ1-4GlcNAc-	17
ST8Sia III	<i>st8sia3</i>		GL/GP	NeuAcα2-8NeuAcα2-3Galβ1- NeuAcα2-8NeuAcα2-6GalNAc-	18
ST8Sia IV	<i>st8sia4</i>	PST	GP	(NeuAcα2-8) _n NeuAcα2-3Galβ1-4GlcNAc-	19
ST8Sia V	<i>st8sia5</i>	G _{T3} synthase - SAT-V	GL	G _{D1c} , G _{T1a} , G _{Q1b} , G _{T3}	20
ST8Sia VI	<i>st8sia6</i>		O-GP	NeuAcα2-8 NeuAcα2-3Galβ1-3GalNAc-	21
Lost in human	<i>st8sia7</i>		?	?	
FucT VII	<i>fut7</i>	α1-3FucT	GP/GL	*NeuAcα2-3Galβ1-4GlcNAc- Fuca1-3/ *Sialylated poly-LacNAc chains, to the GlcNAc residue nearest to sialic acids	22,23
FucT VIII	<i>fut8</i>	α1-6FucT	GP	GlcNAcβ1-4GlcNAc-Asn Fuca1-6/	24
FucT IX	<i>fut9B</i> <i>fut9D</i>	α1-3FucT	GP/GL	*Galβ1-4GlcNAc- Fuca1-3/ *Distal GlcNAc units on neutral LacNAc chains *Innermost GlcNAc unit on sialylated poly-LacNAc chains	25
	<i>fut9C1</i> <i>fut9C2</i>	zFT1 zFT2	?	Galβ1-4GlcNAc- Fuca1-3/	26
FucT X	<i>fut10</i>	α1-3FucT	N-GP (core chitobiose?)	GlcNAcβ1-4GlcNAc- Fuca1-3/	27

Supplementary references

- (1) Harduin-Lepers, A.; Petit, D.; Mollicone, R.; Delannoy, P.; Petit, J.-M.; Oriol, R. Evolutionary history of the alpha2,8-sialyltransferase (ST8Sia) gene family: tandem duplications in early deuterostomes explain most of the diversity found in the vertebrate ST8Sia genes. *BMC Evol. Biol* **2008**, *8*, 258.
- (2) Harduin-Lepers Comprehensive Analysis of Sialyltransferases in Vertebrate Genomes. *Glycobiology Insights* **2010**, *29*.
- (3) Petit, D.; Mir, A.-M.; Petit, J.-M.; Thisse, C.; Delannoy, P.; Oriol, R.; Thisse, B.; Harduin-Lepers, A. Molecular phylogeny and functional genomics of beta-galactoside alpha2,6-sialyltransferases that explain ubiquitous expression of st6gal1 gene in amniotes. *J. Biol. Chem* **2010**, *285*, 38399-38414.
- (4) Dehnert, K. W.; Beahm, B. J.; Huynh, T. T.; Baskin, J. M.; Laughlin, S. T.; Wang, W.; Wu, P.; Amacher, S. L.; Bertozzi, C. R. Metabolic labeling of fucosylated glycans in developing zebrafish. *ACS Chem. Biol* **2011**, *6*, 547-552.
- (5) Lee, Y. C.; Kurosawa, N.; Hamamoto, T.; Nakaoka, T.; Tsuji, S. Molecular cloning and expression of Gal beta 1,3GalNAc alpha 2,3-sialyltransferase from mouse brain. *Eur. J. Biochem* **1993**, *216*, 377-385.
- (6) Giordanengo, V.; Bannwarth, S.; Laffont, C.; Van Miegem, V.; Harduin-Lepers, A.; Delannoy, P.; Lefebvre, J. C. Cloning and expression of cDNA for a human Gal(beta1-3)GalNAc alpha2,3-sialyltransferase from the CEM T-cell line. *Eur. J. Biochem* **1997**, *247*, 558-566.
- (7) Kitagawa, H.; Paulson, J. C. Cloning and expression of human Gal beta 1,3(4)GlcNAc alpha 2,3-sialyltransferase. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **1993**, *194*, 375-382.
- (8) Kitagawa, H.; Paulson, J. C. Cloning of a novel alpha 2,3-sialyltransferase that sialylates glycoprotein and glycolipid carbohydrate groups. *J. Biol. Chem* **1994**, *269*, 1394-1401.
- (9) Ishii, A.; Ohta, M.; Watanabe, Y.; Matsuda, K.; Ishiyama, K.; Sakoe, K.; Nakamura, M.; Inokuchi, J.; Sanai, Y.; Saito, M. Expression cloning and functional characterization of human cDNA for ganglioside GM3 synthase. *J. Biol. Chem* **1998**, *273*, 31652-31655.
- (10) Chisada, S.-i.; Yoshimura, Y.; Sakaguchi, K.; Uemura, S.; Go, S.; Ikeda, K.; Uchima, H.; Matsunaga, N.; Ogura, K.; Tai, T.; Okino, N.; Taguchi, R.; Inokuchi, J.; Ito, M. Zebrafish and Mouse 2,3-Sialyltransferases Responsible for Synthesizing GM4 Ganglioside. *Journal of Biological Chemistry* **2009**, *284*, 30534-30546.
- (11) Ikehara, Y.; Kojima, N.; Kurosawa, N.; Kudo, T.; Kono, M.; Nishihara, S.; Issiki, S.; Morozumi, K.; Itzkowitz, S.; Tsuda, T.; Nishimura, S. I.; Tsuji, S.; Narimatsu, H. Cloning and expression of a human gene encoding an N-acetylgalactosamine-alpha2,6-sialyltransferase (ST6GalNAc I): a candidate for synthesis of cancer-associated sialyl-Tn antigens. *Glycobiology* **1999**, *9*, 1213-1224.
- (12) Samyn-Petit, B.; Krzewinski-Recchi, M. A.; Steelant, W. F.; Delannoy, P.; Harduin-Lepers, A. Molecular cloning and functional expression of human ST6GalNAc II. Molecular expression in various human cultured cells. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1474*, 201-211.
- (13) Harduin-Lepers, A.; Mollicone, R.; Delannoy, P.; Oriol, R. The animal sialyltransferases and sialyltransferase-related genes: a phylogenetic approach. *Glycobiology* **2005**, *15*, 805-817.
- (14) Harduin-Lepers, A.; Stokes, D. C.; Steelant, W. F.; Samyn-Petit, B.; Krzewinski-Recchi, M. A.; Vallejo-Ruiz, V.; Zanetta, J. P.; Augé, C.; Delannoy, P. Cloning, expression and gene organization of a human Neu5Ac alpha 2-3Gal beta 1-3GalNAc alpha 2,6-sialyltransferase: hST6GalNAcIV. *Biochem. J* **2000**, *352 Pt 1*, 37-48.
- (15) Nara, K.; Watanabe, Y.; Maruyama, K.; Kasahara, K.; Nagai, Y.; Sanai, Y. Expression cloning of a CMP-NeuAc:NeuAc alpha 2-3Gal beta 1-4Glc beta 1-1'Cer alpha 2,8-sialyltransferase (GD3 synthase) from human melanoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **1994**, *91*, 7952-7956.
- (16) Nakayama, J.; Fukuda, M. N.; Hirabayashi, Y.; Kanamori, A.; Sasaki, K.; Nishi, T.; Fukuda, M. Expression cloning of a human GT3 synthase. GD3 AND GT3 are synthesized by a single enzyme *J. Biol. Chem* **1996**, *271*, 3684-3691.
- (17) Scheidegger, E. P.; Sternberg, L. R.; Roth, J.; Lowe, J. B. A human STX cDNA confers polysialic acid expression in mammalian cells. *J. Biol. Chem* **1995**, *270*, 22685-22688.
- (18) Lee, Y. C.; Kim, Y. J.; Lee, K. Y.; Kim, K. S.; Kim, B. U.; Kim, H. N.; Kim, C. H.; Do, S. I.

- Cloning and expression of cDNA for a human Sia alpha 2,3Gal beta 1, 4GlcNA:alpha 2,8-sialyltransferase (hST8Sia III). *Arch. Biochem. Biophys* **1998**, *360*, 41-46.
- (19) Nakayama, J.; Fukuda, M. N.; Fredette, B.; Ranscht, B.; Fukuda, M. Expression cloning of a human polysialyltransferase that forms the polysialylated neural cell adhesion molecule present in embryonic brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **1995**, *92*, 7031-7035.
- (20) Kim, Y. J.; Kim, K. S.; Do, S.; Kim, C. H.; Kim, S. K.; Lee, Y. C. Molecular cloning and expression of human alpha2,8-sialyltransferase (hST8Sia V). *Biochem. Biophys. Res. Commun* **1997**, *235*, 327-330.
- (21) Teinturier-Lelièvre, M.; Julien, S.; Juliant, S.; Guerardel, Y.; Duonor-Cérutti, M.; Delannoy, P.; Harduin-Lepers, A. Molecular cloning and expression of a human hST8Sia VI (alpha2,8-sialyltransferase) responsible for the synthesis of the diSia motif on O-glycosylproteins. *Biochem. J* **2005**, *392*, 665-674.
- (22) Stroud, M. R.; Holmes, E. H. Fucosylation of complex glycosphingolipids by recombinant fucosyltransferase-VII. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **1997**, *238*, 165-168.
- (23) Britten, C. J.; van den Eijnden, D. H.; McDowell, W.; Kelly, V. A.; Witham, S. J.; Edbrooke, M. R.; Bird, M. I.; de Vries, T.; Smithers, N. Acceptor specificity of the human leukocyte alpha3 fucosyltransferase: role of FucT-VII in the generation of selectin ligands. *Glycobiology* **1998**, *8*, 321-327.
- (24) Voynow, J. A.; Kaiser, R. S.; Scanlin, T. F.; Glick, M. C. Purification and characterization of GDP-L-fucose-N-acetyl beta-D-glucosaminide alpha 1----6fucosyltransferase from cultured human skin fibroblasts. Requirement of a specific biantennary oligosaccharide as substrate. *J. Biol. Chem* **1991**, *266*, 21572-21577.
- (25) Toivonen, S.; Nishihara, S.; Narimatsu, H.; Renkonen, O.; Renkonen, R. Fuc-TIX: a versatile alpha1,3-fucosyltransferase with a distinct acceptor- and site-specificity profile. *Glycobiology* **2002**, *12*, 361-368.
- (26) Kageyama, N.; Natsuka, S.; Hase, S. Molecular cloning and characterization of two zebrafish alpha(1,3)fucosyltransferase genes developmentally regulated in embryogenesis. *J. Biochem* **1999**, *125*, 838-845.
- (27) Mollicone, R.; Moore, S. E. H.; Bovin, N.; Garcia-Rosasco, M.; Candelier, J.-J.; Martinez-Duncker, I.; Oriol, R. Activity, splice variants, conserved peptide motifs, and phylogeny of two new alpha1,3-fucosyltransferase families (FUT10 and FUT11). *J. Biol. Chem* **2009**, *284*, 4723-4738.

A.2.3 Conclusions :

Nous avons analysé et caractérisé les glycoconjugués (GSL, Ng et Og) de la lignée cellulaire ZFL. Les GSL présentent du LacCer, ainsi que la série Ganglio (Gg) et la série Neolacto (nLc) qui est substituée par une HexNac supplémentaire. Les GSL des cellules ZFL sont dominés par des Gg de types GM2 constitués de deux bases lipidiques distinctes : les céramides d18:1-C16:0 et d18:1-C24:1. La série Gg des cellules ZFL se compose des éléments suivants : GA2, GA1, GM3, GM2 et GM1. La série nLc des cellules ZFL est composée de motifs mono ou di-LacNac pouvant être substitués en position terminale par de l'acide sialique. Les Ng sont dominés par des oligomannoses et présentent des structures complexes minoritaires du type bi- et tri-antennées. Les Ng complexes présentent le *zebrafish epitope* qui est un sLe^x substitué par du galactose en position β 1-4 que notre équipe avait précédemment identifié dans les embryons du ZF ([Chang, Harduin-Lepers et al. 2009](#)). Les Ng complexes présentent également des unités de fucose sur le noyau et/ou sur les antennes ainsi que 1 à 4 unités. Les Og se composent uniquement du noyau 1 substitué par 1 à 4 unités de Neu5Ac réparties en monomères ou en dimères sur le Gal et la GalNac. La structure la plus complexe des Og est la suivante : Neu5Ac α 2-8Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3(Neu5Ac α 2-8Neu5Ac α 2-6)GalNac.

Nous avons également analysé le niveau d'expression des ST (ST3Gal[1-r1, 1-r2, 1-r3, 1-r4, 2-r1, 2-r2, 3-r1, 3-r2, 4, 5-r1, 5-r2] ; ST6GalNac[1-r1, 1-r2, 1-r3, 1-r4, 2-r1, 2-r2, 3, 4, 5-r1, 5-r2, 6] ; ST6Gal[1,2, 2-r] et ST8Sia[1,2,3,4,5,6,7]) et des FT (FUT [zFT1, zFT2, 7, 9B, 9D, 8, 10]) par RT-PCR dans les cellules ZFL. Les résultats obtenus montrent l'activité transcriptionnelle de ST3Gal(2-r1, 3-r2,4 et 5-r1), ST6GalNac(1-r1, 2-r1, 2-r2, 3, 4, 5-r1), de ST6Gal2-r, de ST8Sia6 et de toutes les FUT testées. Il s'avère que les activités des gènes identifiés lors des expériences de RT-PCR concordent avec les structures découvertes lors des analyses structurales (*cf.* discussions).

Nous avons aussi analysé l'incorporation de d'acide sialique exogène dans les cellules ZFL et nous avons observé que l'acide sialique naturel (Neu5Gc) et synthétique (SiaNAI) (*cf.* Partie B) s'incorporent dans les cellules à partir du milieu de culture. Nous avons quantifié cette incorporation par HPLC et nous avons constaté que ces deux acides sialiques se retrouvent préférentiellement dans les glycoprotéines (env. 35%), puis dans le cytoplasme (25%) et enfin dans les glycolipides (4%). Les tests de traçage du SiaNAI en *click-chemistry* ont montrés une incorporation importante de l'acide sialique exogène au niveau du glycocalix des cellules ZFL. Le SiaNAI n'a pas été détecté dans le cytoplasme des cellules ZFL, probablement en raison d'une concentration trop faible dans ce compartiment cellulaire très vaste. Ces informations permettent de définir l'environnement glycanique de ce modèle cellulaire et d'envisager des expériences de glycobiologie fonctionnelle sur ce modèle.

Chapitre 3 : Cartographie glycannique des organes du ZF

A.3.1 Modes Opératoires :

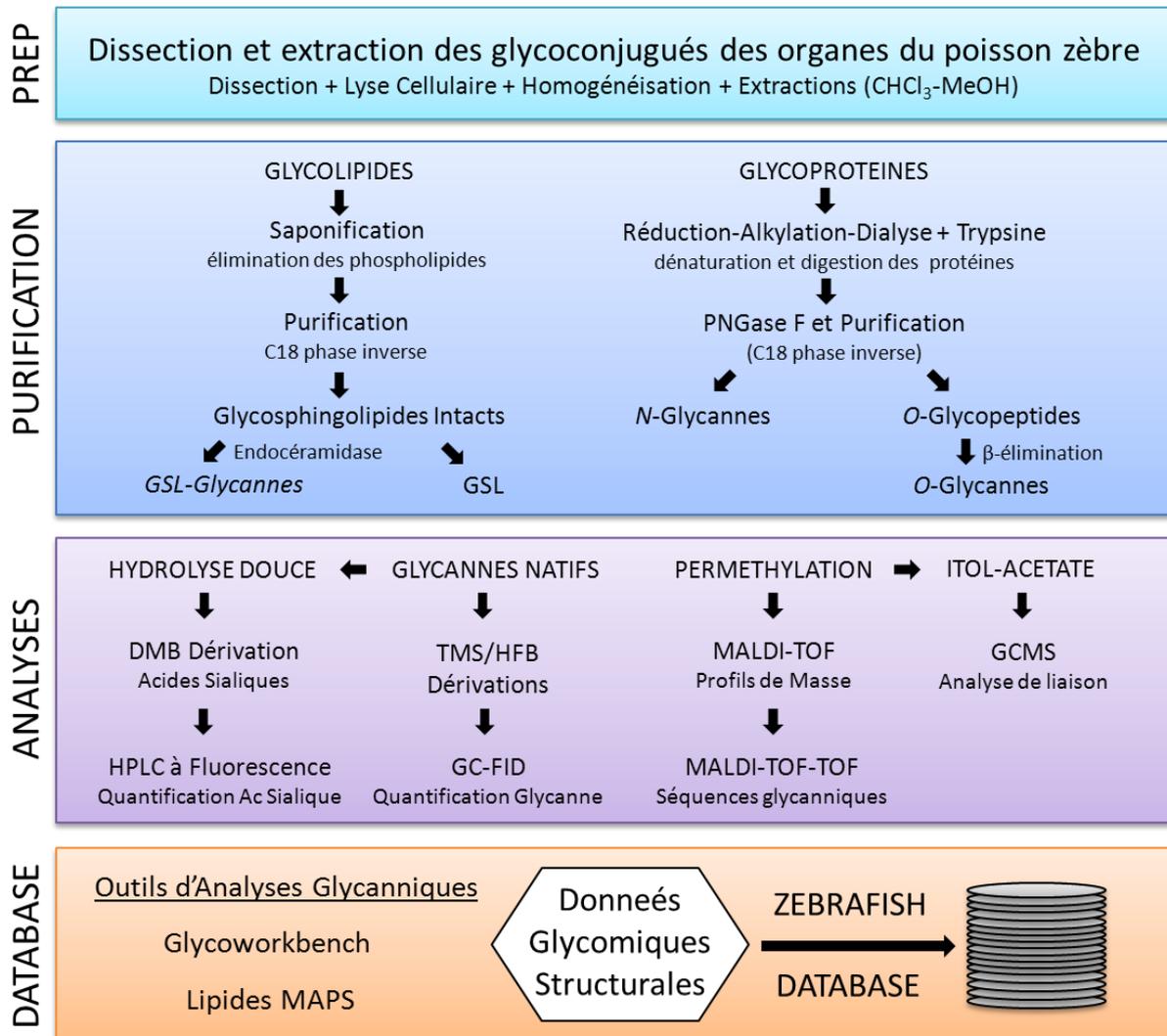


Figure 13 : Procédure d'analyses des glycannes des glycolipides et glycoprotéines du poisson zèbre.

Cette étude a pour objectif d'établir la première carte de glycosylation complète des glycosphingolipides et des glycoprotéines (Ng et Og) des organes du poisson zèbre adulte par des techniques de purification et des méthodes d'analyses de spectrométrie de masse. Aussi, nous avons divisé ces travaux en quatre étapes : la préparation, la purification, l'analyse et la bio-informatique (les détails techniques de chaque partie sont disponibles dans la section *Matériels et Méthodes*). Cette étude est réalisée en collaboration interne avec le Dr Nao Yamakawa qui s'est occupée de la purification et de l'analyse des GP et le Dr Olga Plechakova qui s'est occupée de développer la *Database* des glycannes du ZF. En

parallèle de ces données structurales, une collaboration interne avec les Dr Emeline Fabre et Anne Harduin-Lepers a permis développer les analyses de biologie moléculaire sur les fucosyltransférases et sialyltransférases. Une collaboration externe internationale avec le Pr Ken Kitajima de l'université de Nagoya au Japon a également permis de réaliser des marquages par immunofluorescence du KDN sur des glycoprotéines et des tissus spécifiques du ZF adulte.

La première partie est la préparation des échantillons qui consiste à prélever, isoler et laver les organes du ZF adulte afin d'effectuer une lyse cellulaire, suivie d'une homogénéisation pour séparer et collecter un maximum de glycolipides et de glycoprotéines par une technique d'extraction au $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$. Nous avons travaillé sur un ensemble de 30 individus adultes constitués de 15 mâles et de 15 femelles sur lesquels nous avons collecté 8 organes : le cerveau, le cœur, les branchies, le foie, l'intestin, la peau, les testicules et les ovaires. Nous avons volontairement étudié un ensemble important d'individus de type Tübingen (TU) pour que nos résultats soient le reflet direct de la glycosylation « moyenne » du ZF adulte et ne soient pas faussés par un échantillonnage trop petit.

La seconde partie est la purification des glycannes des glycoconjugués par des techniques classiques de biochimie associées à l'utilisation de réactions enzymatiques (PNGase F et Endocéramidase) et chimiques (β -élimination) pour la libération des glycannes. L'utilisation de colonnes de purification de C18 en phase inverse et de charbon actif permet de purifier efficacement les glycannes d'intérêts, en éliminant les contaminants naturels et les sels réactionnelles, pour obtenir une analyse spectroscopique de qualité.

La troisième partie concerne l'acquisition des données grâce à large panel de techniques d'analyses structurales composées de Spectrométrie de Masse (MS et MS-MS), de Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de masse (GC-MS) et de Chromatographie Liquide de Haute Performance HPLC couplée à un détecteur de fluorescence. L'ensemble des glycannes purifiés a été analysé sous forme native et perméthylée en fonction des analyses envisagées.

La quatrième partie implique l'analyse des données structurales et la réalisation de la première banque de données glycaniques dédiées au modèle biologique du ZF. Cette banque de données inclura toutes les données structurales MS et MS/MS détaillées que nous avons analysées, ainsi que les résultats obtenus en parallèles en GC et sur la quantification par HPLC. Nous avons également développé des approches de biologie moléculaire et de microscopie par immunofluorescence sur plusieurs organes pour confirmer et approfondir les résultats obtenus en analyses structurales.

A.3.2 Les Glycosphingolipides du Poisson Zèbre Adulte :

L'analyse des GSL de ZF a commencé par l'étude de la composition en monosaccharides par GCMS et de la caractérisation de l'acide sialique par des méthodes d'HPLC à fluorescence. Puis, nous nous sommes intéressés à la partie lipidique pour l'identification des bases lipidiques présentes dans ce modèle. Nous avons également analysé la présence des AG dans les différents organes du ZF par GCMS. Ensuite nous avons analysé les GSL perméthylés par MS et MS/MS pour caractériser les séquences glycaniques, ainsi que les bases lipidiques présentes dans les organes du ZF. Nous avons poursuivi ces analyses par la séparation des GSL d'intérêts sur Chromatographie-*flash* de silice et leurs digestions enzymatiques, afin de caractériser finement ces molécules. Nous n'avons pas encore déterminé précisément la nature des monosaccharides et des liaisons de ces structures nouvelles. La description de ces structures et de leurs séries est encore hypothétique, mais elle se base sur les séquences glycaniques identifiées (MS/MS), les données bibliographiques de la glycobiologie marine et la connaissance des voies de biosynthèse des glycannes chez les vertébrés. Enfin, nous avons relevé les niveaux d'expression des GT de la glycosylation terminale pour corrélérer leurs niveaux d'expression avec les structures identifiées. Suite aux observations structurales, nous avons approfondi nos recherches sur certaines spécificités, que nous avons découvertes dans les organes du poisson zèbre par l'utilisation d'immunomarquage. Nous allons maintenant résumer l'ensemble de ces travaux de caractérisation structurale sur les GSL et les glycoprotéines.

A.3.2.1 Analyses par GCMS et HPLC des GSL :

Nous avons réalisé une quantification relative de la partie glycaniques par Chromatographie en phase Gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GCMS) en utilisant une technique de dérivation au Triméthylsilylane (TMS) après une méthanolyse.

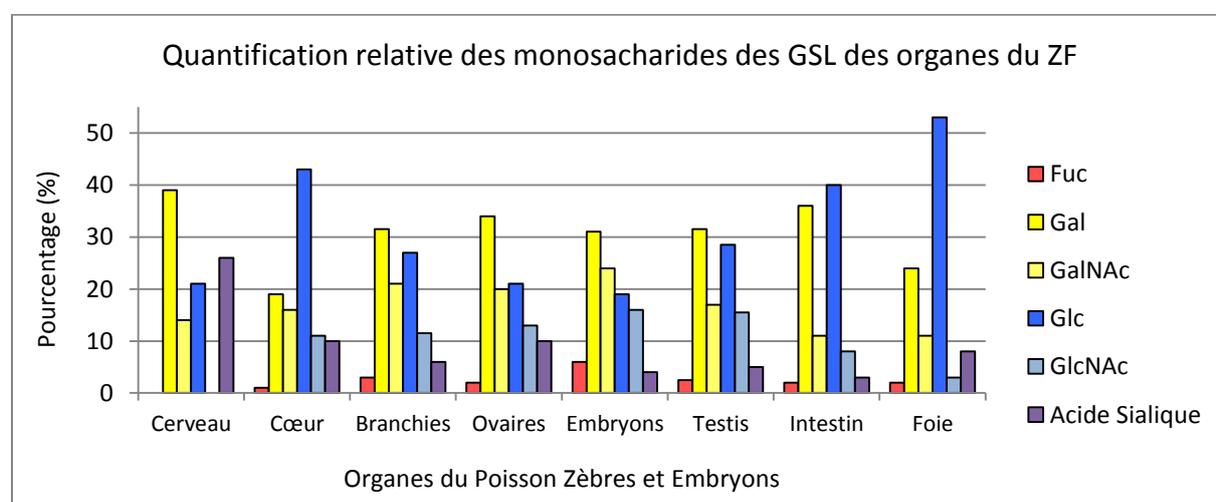


Figure 14 : Quantification relative des monosaccharides présents dans les GSL des organes du ZF adulte.

Les analyses de GCMS ont permis de définir la quantité relative de chaque monosaccharide entrant dans la composition des GSL de chaque organe. Bien que cette analyse soit générale, elle permet d'appréhender les différentes séries de GSL présentes dans les organes du ZF. Les proportions des séries Gg ou Lc/nLc se comparent respectivement au rapport GalNAc/GlcNAc. De plus, nous visualisons aussi l'ensemble des acides sialiques présents dans les GSL, qui ne sont plus distinguables par type (Ac/Gc) après les étapes de dérivation aux TMS. Il apparaît ici clairement que le cerveau est l'organe qui possède le plus d'acide sialique sur ses GSL, probablement au niveau de séries gangliosidiques. De plus, nous pouvons prévoir que des structures fucosylées sont présentes dans l'ensemble des organes à l'exception du cerveau, qui ne semble pas en détenir. La présence de GlcNAc dans l'ensemble des organes à l'exception du cerveau indique que des structures de type Lc/nLc sont présentes chez le ZF. Le rapport Glc/Gal est un indicateur de la répartition des GSL : si une dominance de Glc est constatée, cela indique que les structures des GSL sont majoritairement simples (GlcCer, SialylGlcCer et LacCer) et si une dominance de galactose est constatée, cela indique que les structures des GSL sont majoritairement plus complexes (\geq LacCer). Cependant ce ratio n'est juste qu'un indicateur car des structures (habituellement minoritaires) de GalCer ou de série Gala peuvent perturber cette règle. Nous avons poursuivi cette première approche de composition glycanique des GSL par l'identification du type d'acide sialique dans les différents organes du ZF en utilisant une dérivation au DMB (1,2-diamino-4,5-méthylènedioxybenzène) de l'acide sialique après hydrolyse des GSL et une détection en fluorescence par HPLC.

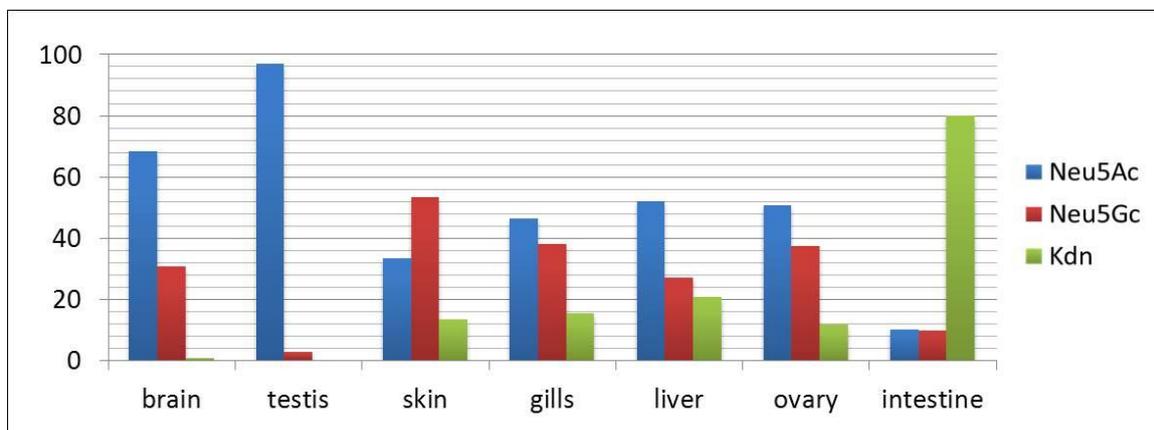


Figure 15 : Quantification relative de l'acide sialique dans les GSL des organes du poisson zèbre adulte. Quantification relative réalisée par HPLC à fluorescence par dérivation au DMB après hydrolyse.

Nous avons ainsi pu distinguer le type d'acide sialique et leurs quantités relatives dans les GSL de chaque organe du ZF. Nous avons détecté la présence de trois acides sialiques différents dans le ZF (en utilisant des acides sialiques standards dérivés au DMB) : le Neu5Ac, le Neu5Gc et le KDN. Nous avons détecté une présence très importante de KDN dans les GSL intestinaux du ZF à hauteur de 80 % et une présence en quantité moins importante (\geq 10 %) dans la peau, les branchies, le foie et les ovaires. Les résultats attestent

également de la présence du Neu5Gc (30 %) dans les GSL cérébraux, la présence de ce type d'acide sialique dans le cerveau est relativement rare chez les vertébrés ([Davies and Varki 2013](#)). Nous observons en outre certaines disparités entre le ratio Neu5Ac/Neu5Gc de plusieurs organes. Aussi, nous constatons une dominance franche du Neu5Ac dans le cerveau, les testicules et le foie ; ainsi qu'une dominance légère du Neu5Ac pour les branchies et les ovaires. Seule, la peau présente un ratio Neu5Ac/Neu5Gc favorable au Neu5Gc. Ces analyses nous permettent de savoir qu'elles sont les acides sialiques présents dans les organes du poisson zèbre et de nous interroger sur la présence en quantité importante du KDN dans les intestins ou encore du Neu5Gc dans le cerveau.

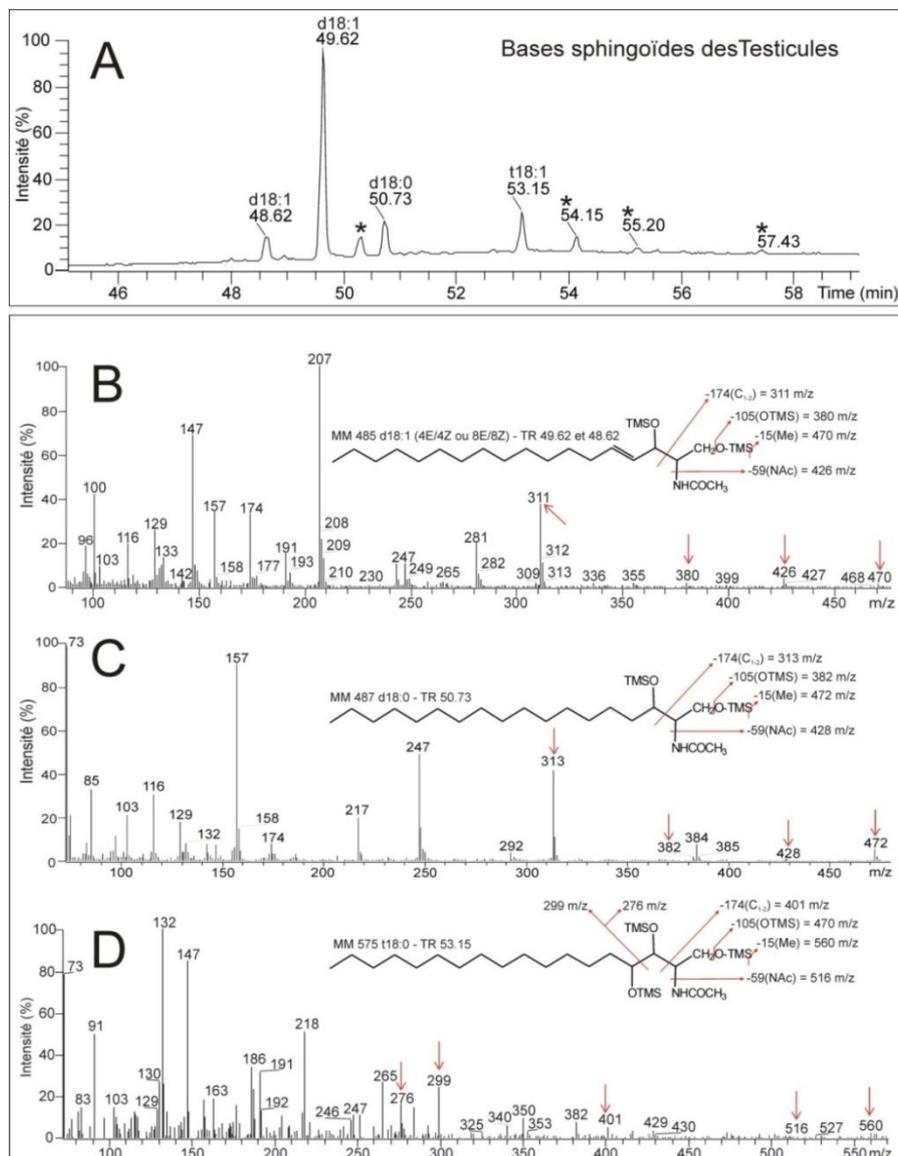


Figure 16 : Analyses des bases sphingolipidiques dans les testicules du ZF.

Les GSL des testicules de ZF ont été méthanolysés, *N*-réacétylés et dérivés au TMS avant d'être analysés par GCMS. Les acides gras ont également été retirés par une extraction à l'heptane lors de la préparation de l'échantillon, juste après la méthanolysé. Le chromatogramme obtenu (A) montre la proportion des 3 bases

sphingoïdes identifiées dans les testicules du ZF adulte. Les spectrogrammes issus du mode EI (Impact Electronique) illustrent les fragments ioniques caractéristiques d'une base de sphingénine d18:1 (B), de sphinganine d18:0 (C) et de phytosphingosine t18:0 (D).

Nous avons analysé les bases sphingoïdes présentes dans les GSL des organes du poisson zèbre, par une technique de GCMS utilisant une libération des bases sphingoïdes par méthanolyse, suivie d'une *N*-acétylation de leur groupe amine et d'une dérivation au TMS. Nous avons illustré les résultats avec les bases sphingoïdes des testicules du poisson zèbre (cf. Figure 16). Ces résultats montrent la présence de 3 types de bases sphingoïdes distinctes : la sphingénine (d18:1), la sphinganine (d18:0) et phytosphingosine (t18:0). Nous avons identifié deux signaux correspondant à de la sphingénine, la différence de temps de rétention de ces molécules est due à la position et à la configuration de l'insaturation qui peuvent être de type $4^E/4^Z$ ou $8^E/8^Z$. Il n'est pas possible de différencier ces structures en se basant sur la masse dans cette analyse, puisque ces signaux ont exactement le même spectre de masse correspondant au spectre (B) de la figure 15. Nous devrions utiliser des standards pour déterminer la configuration exacte de ces sphingénines. Nous avons étendu cette expérience à l'ensemble des organes du ZF pour déterminer les quantités relatives de chaque base sphingoïde.

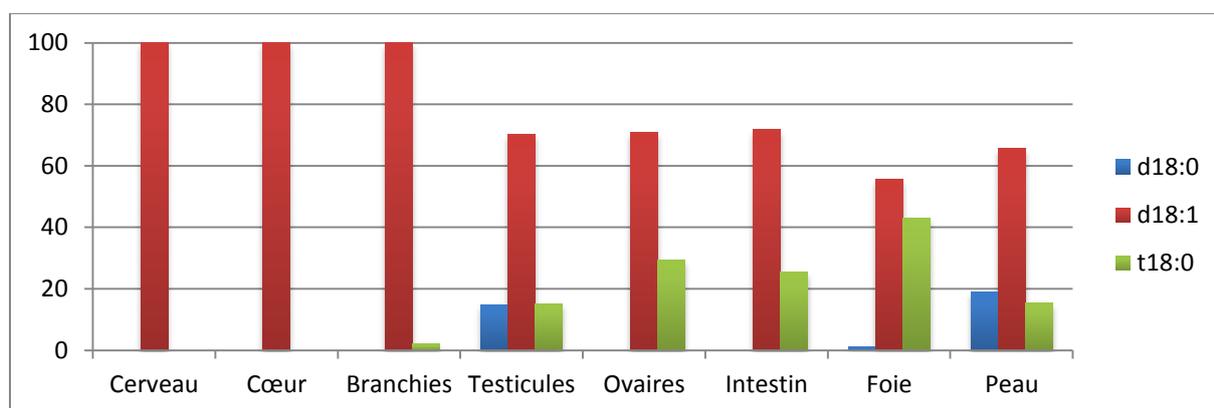


Figure 17 : Quantification des sphingosines présents dans les GSL du poisson zèbre adulte. Quantification relative réalisée par GCMS par dérivation au TMS après méthanolyse et élimination par extraction à l'heptane des FAME (Fatty Acid Methyl Ester).

Ces analyses confirment la présence de trois bases sphingoïdes et illustrent leur répartition dans les organes du ZF. La sphingénine est la base majoritaire de l'ensemble du ZF et se trouve de manière quasi-exclusive dans le cerveau, le cœur et les branchies. La phytosphingosine est présente à plus de 15% dans les testicules, les ovaires, les intestins, le foie et la peau. La sphinganine est une base minoritaire puisqu'elle ne dépasse pas les 20% et se trouve principalement dans les testicules et la peau. Ces données nous permettent de visualiser la nature de la base sphingoïde dans l'ensemble des organes du ZF adulte.

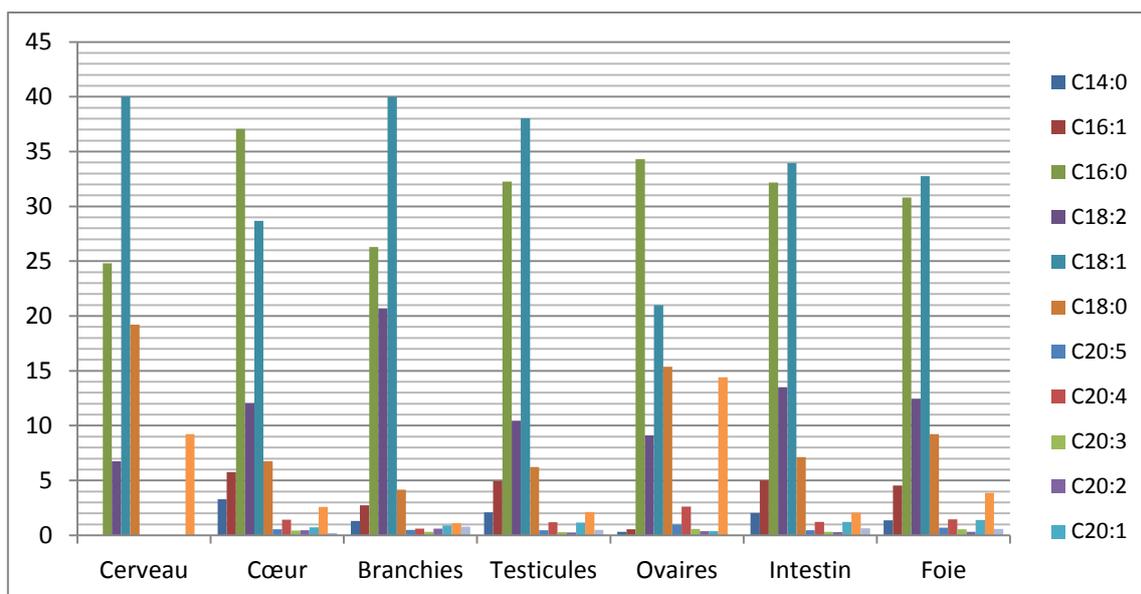


Figure 18 : Quantification des acides gras totaux présents dans les organes du poisson zèbre adulte. Quantification relative réalisée sur les FAME (Fatty acid méthyl Ester) récupéré par une extraction à l’heptane après méthanolyse des GSL des organes du poisson zèbre.

Nous avons réalisé une quantification des FAME (Fatty Acid Methyl Ester) issus de la méthanolyse des GSL et isolés grâce à une triple extraction à l’heptane. Les résultats reflètent la composition en acides gras libres et conjugués des organes du poisson zèbre et montrent une forte dominance des acides gras de type C16:0 (Palmitique), C18:2 (Linoléique), C18:1 (oléique) et C18:0 (Stéarique) dans l’ensemble des organes. De nombreux autres acides gras ont été identifiés mais restent très minoritaires à l’exception du C22:6 dans le cerveau, les ovaires et le foie. Les analyses que nous avons effectuées n’ont pas permis de mettre en évidence des AG supérieurs au C22:6 dans l’ensemble des organes du ZF, bien que nous savons pertinemment qu’ils existent. Cependant, les quantités de ces AG gras longs (\geq C24) sont plus faibles, ceci expliquerait pourquoi nous ne les avons pas détectés.

A.3.2.2 Analyses par spectrométrie de masse des GSL :

Nous avons analysé les GSL perméthylés des organes du ZF adulte par MALDI-TOF et MALDI-TOF-TOF. Nous avons observé des différences importantes dans la distribution des structures glycaniques, mais également une répartition particulière des céramides. Lors des analyses MS, nous avons observé que les HexCer compris entre 800-1000 Da représentent la classe majeure des GSL de tous les organes et ne divergent que par leurs parties lipidiques. En effet, les HexCer représentent environ 60% des GSL totaux et nuisent aux observations les plus intéressantes des GSL complexes, qui se situent entre 1000-4000 Da que nous avons choisi d’illustrer.

La présentation des ions de fragmentation utilise la nomenclature de Domon ([Domon 1988](#)) et s'appuie sur des articles spécialisés dans l'analyse MS/MS des GSL ([Domon and Costello 1988](#); [Levery 2005](#)). La fragmentation par MS/MS des GSL perméthylés est donnée dans la Figure 19 et la Figure 21 pour illustrer la nomenclature utilisée, le choix de la dérivation et l'analyse des ions obtenus dans le CID du MALDI-TOF/TOF.

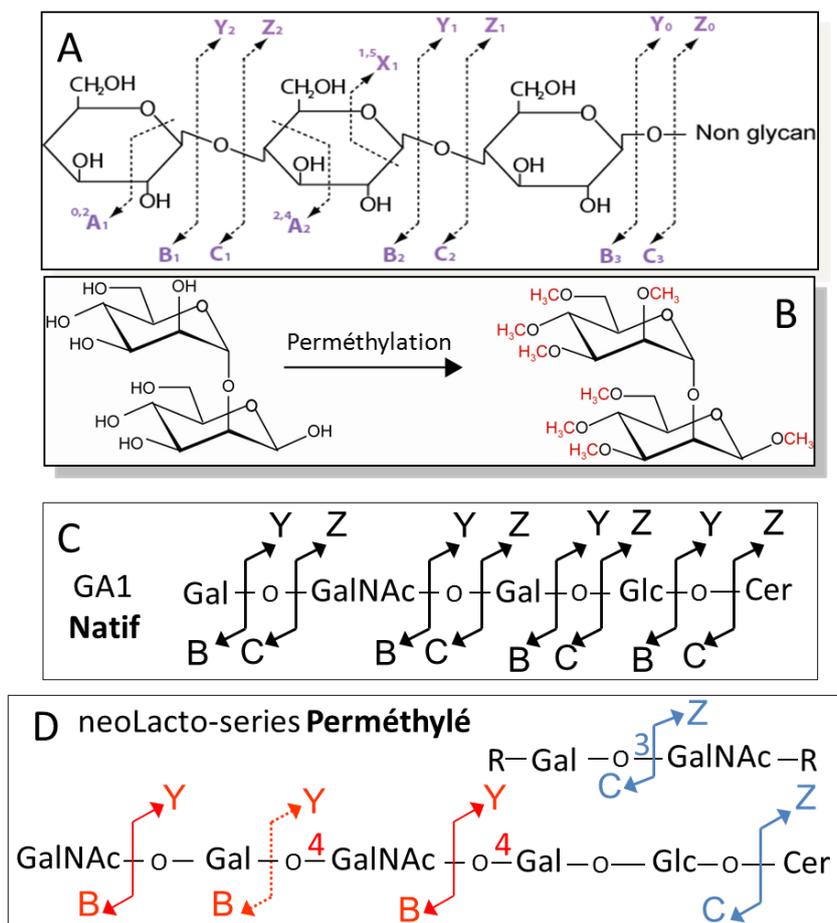


Figure 19 : Illustration générale de la fragmentation des glycanes en CID par MS/MS.

Le rectangle (A) illustre la nomenclature linéaire de fragmentation de Domon ([Domon 1988](#)) valable pour les glycanes natifs et perméthylés. Le rectangle (B) montre les effets de la perméthylation sur les hydroxyles libres des structures glycaniques. Le rectangle (C) décrit les fragmentations intercycliques obtenues sur un GSL natif, alors que le rectangle (D) décrit les fragmentations obtenues sur un GSL perméthylé.

Les fragments générés par CID en MS/MS peuvent être de type X_n/A_n (intracyclique) ou de type Y_n/B_n et Z_n/C_n (intercyclique) en fonction de la puissance en keV de la fragmentation (cf. Figure 19). La technique de fragmentation utilisée lors des analyses des GSL est de basse énergie et ne génère que des fragments intercycliques que nous allons détailler. Les fragments Y et Z sont situés du côté de l'extrémité réductrice ou de l'aglycone de la liaison osidique, alors que les fragments B et C sont situés du côté de l'extrémité non réductrice de la liaison osidique. Dans le cas des GSL, les fragments Y et Z commencent au numéro 0 à partir de la liaison osidique du céramide, alors que les fragments B et C commencent au numéro 1 à partir de l'extrémité non-réductrice. Si un GSL présente une séquence glycanique ramifiée (ex : GM1a Figure 21) alors les fragments de la chaîne

principale porteront le signe α et ceux de la chaîne secondaire porteront le signe β . Les fragments des séquences glycaniques communes à la chaîne principale et aux ramifications ne portent pas de signe (α , β , etc. ...).

La fragmentation des GSL natifs est aléatoire et génère beaucoup de fragments Y/B et Z/C peu sensibles, dont les masses ne diffèrent que légèrement contrairement à la fragmentation des GSL perméthylés. La réaction de perméthylation permet de méthyler les hydroxyles libres des glycanes et rend les fragments analysés plus lourds, plus volatiles, plus stables et plus sensibles lors des analyses MS/MS. Cette dérivation chimique permet également d'orienter les fragments générés lors de la collision dans le CID de la MS/MS. Les fragments Z_0/C_n des GSL perméthylés se situent au niveau la liaison glycanne-céramide et nous donnent de précieuses informations sur la masse du glycanne et du lipide. Les fragments Y/B sont intenses au niveau de la liaison des structures perméthylés R-HexNAc-Hex-R et nous donnent de précieuses informations sur la séquence glycanique et la présence de structures isobariques. La fragmentation de R-Hex-GlcNAc-R' perméthylé liée β 1-4 n'est pas observable pour les fragments Y/B et Z/C, alors que la fragmentation de R-Hex-GlcNAc-R' perméthylé liée β 1-3 génère uniquement des fragments Z/C, ce qui nous donne des indices sur la liaison de ces structures. Enfin, certaines structures glycaniques ne présentent aucun fragment dans les conditions expérimentales, c'est notamment le cas pour les liaisons Hex-Hex et Fuc-Fuc.

Nous illustrerons les spectres MS/MS les plus intéressants de chaque organe et nous récapitulerons l'ensemble des données structurales lors de l'analyse des GSL perméthylés par MS/MS dans un tableau récapitulatif (cf. Tableau 7) à la fin de la sous-partie A.3.2.

A.3.2.2.1 Les GSL du Cerveau :

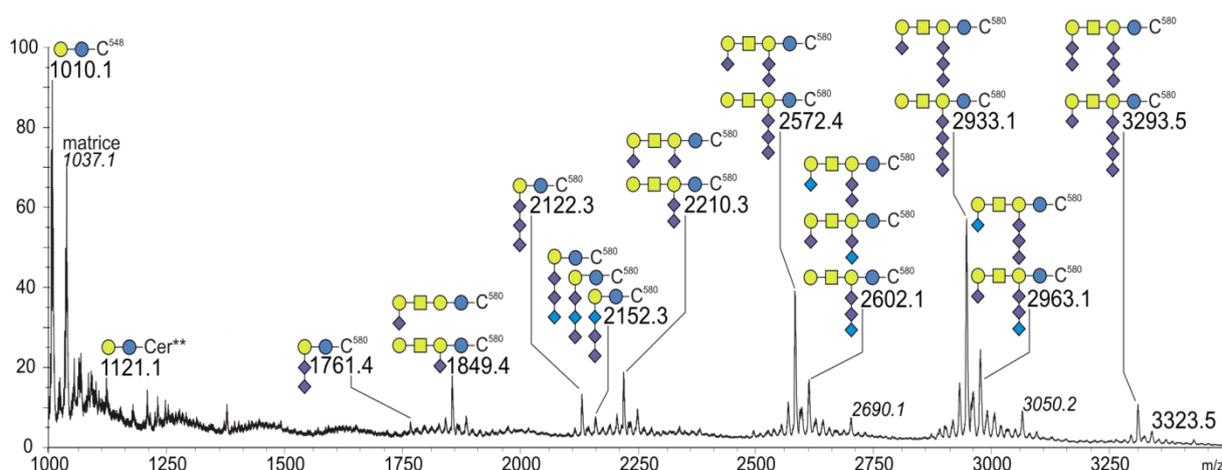


Figure 20 : GSL perméthylés du cerveau du poisson zèbre adulte.

Les GSL du cerveau du poisson zèbre expriment un profil glycanique particulier constitué principalement de GSL acides de type gangliosides et de GSL neutres de type Lac-Cer. Les gangliosides identifiés vont du GD3 au GT3 et du GM1 au GP1, ils supportent de 1 à

5 unités d'acides sialiques. L'analyse des fragments MS suggère la présence d'acide sialique de type Neu5Gc dans les GSL du cerveau du ZF adulte. Les résultats de fragmentation que nous avons obtenus lors des analyses MS/MS (cf. Figure 22) confirment la présence surprenante d'acide sialique de type Neu5Gc (2602 et 2963 m/z) dans le cerveau et ont également permis de distinguer plusieurs sous-familles de gangliosides de type GM1a, GM1b, GD1a, GT1b, GT1c, GQ1c, GP1c et GP1d. Une étude de localisation des Gg cérébraux chez les Actinoptérygiens a mis en évidence sur couche mince la présence de GM1, de GD1a, de GD1b, de GT1b et de Gg inconnu plus lourd dans le cerveau du poisson zèbre, ce qui correspond à nos observations ([Viljetic, Labak et al. 2012](#)). La partie lipidique des gangliosides du cerveau est presque exclusivement constituée de céramides de type d18:1-C18:0 de 576 Da. Ce céramide est présent exclusivement dans le cerveau du ZF adulte et sa biosynthèse devrait s'expliquer par une importante expression locale des gènes *CerS1* et de *CerS4*. Cette observation n'a pour l'instant pas été rattachée à une fonction précise dans le cerveau.

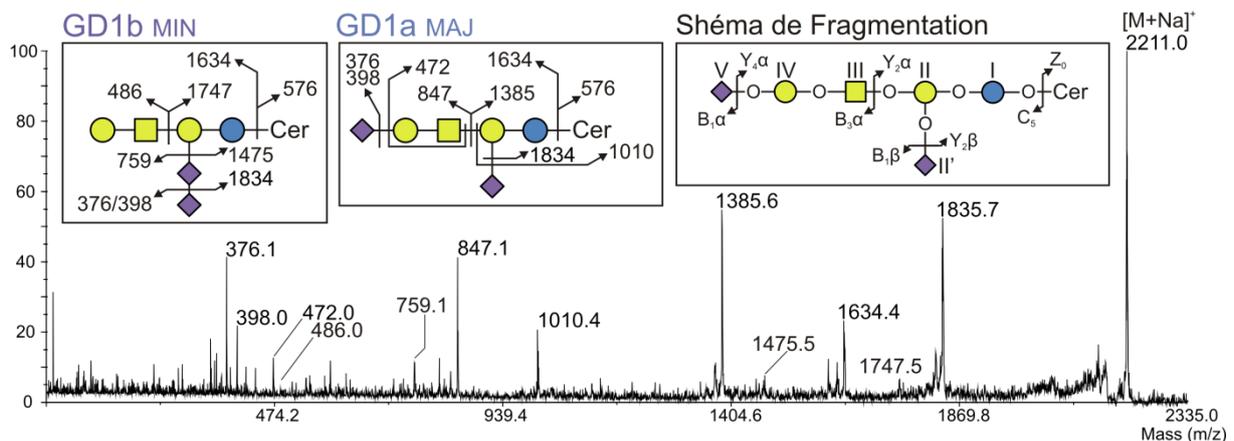
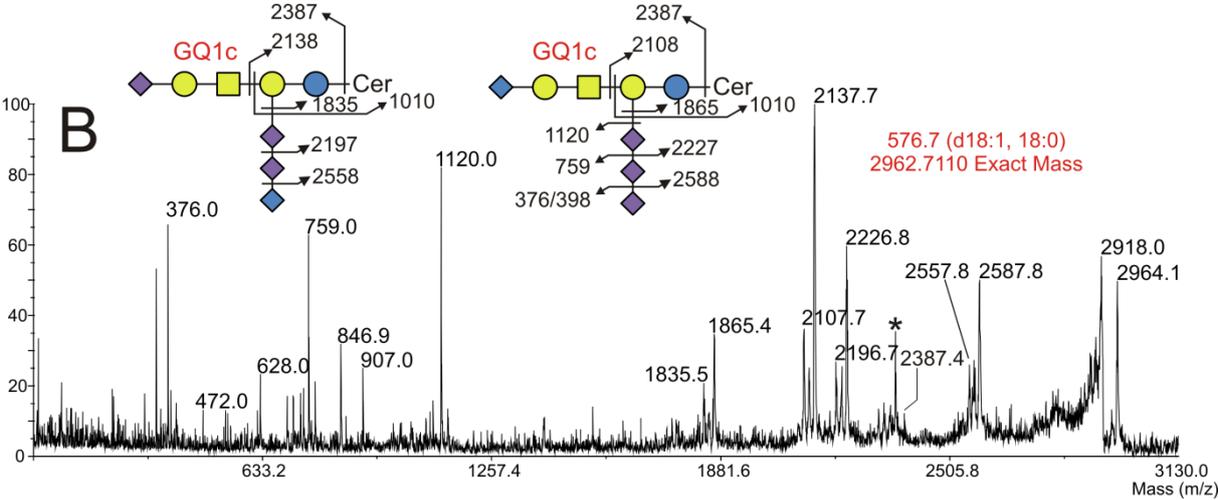
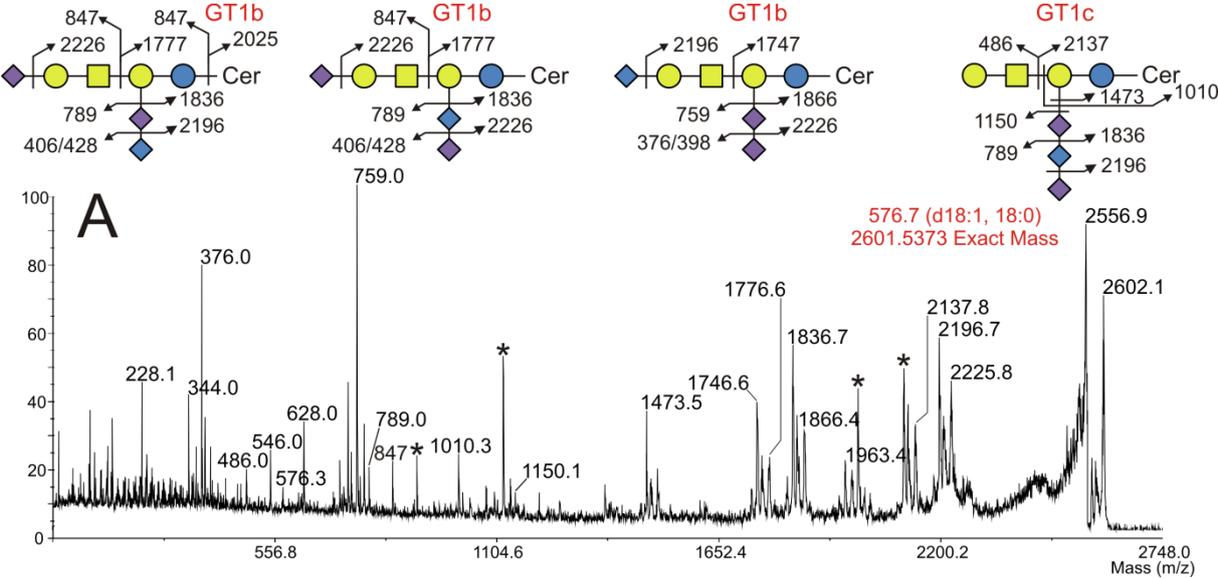


Figure 21 : Illustration de la nomenclature et de l'analyse MS/MS du GD1a et GD1b :

Le spectre MS/MS du signal 2211 m/z des GSL perméthylés du cerveau du ZF correspond à du GM1a et du GM1b. Les fragments primaires générés par CID sont résumés dans le cadre de droite et illustrent les fragments Y/B et Z/C. Les fragments Y/B permettent de définir les séquences du GM1b et du GD1a, alors que les fragments ioniques Z₀/C₅ nous informent sur la masse du glycanne et du lipide. La proportion GD1a/GM1a ne peut pas être précisément déterminée par MS/MS mais un ordre de grandeur peut être déterminé en analysant l'intensité produite par un fragment commun aux deux molécules. Par exemple, les fragments B₃α ou B₁β sont communs aux deux molécules mais les intensités de ces fragments sont supérieures pour le GD1a (847 et 1834 m/z) par rapport au GD1b (486 et 1475 m/z) ce qui indique que le GM1a est la molécule majoritaire.

Nous avons identifié les fragments Y/B et Z/C lors de l'analyse des GSL perméthylés des organes du ZF. La Figure 21 illustre le spectre MS/MS de l'ion 2211 m/z des GSL perméthylés du cerveau, que nous avons interprété comme étant du GD1a et GD1b. Les fragments primaires générés sur la structure du GM1a sont les couples suivants : B₁α/Y₄α (376-398/1834 m/z); B₃α/Y₂α (847/1385 m/z); B₁β/Y₂β (376-398/1834 m/z) et Z₀/C₅ (576/1634). En plus des fragments primaires, il est possible que des fragments secondaires ou doubles fragments apparaissent lors de la collision et correspondent aux fragments : [Y₄α-B₃α] (472 m/z); [Y₄α-C₅] (1259 m/z); [Y₂α-C₅] (810 m/z) et [Y₂α- Y₂β] (1010 m/z). Les structures isobariques (2211 m/z) du GM1a et du GM1b peuvent être identifiées en

analysant les couples de fragments Y/B de ces deux molécules, qui diffèrent par la position d'un Neu5Ac (361 Da). De plus, il ressort de la comparaison de l'intensité d'un ion Y/B entre ces deux molécules que le GM1a est la molécule majoritaire. Nous ne détaillerons pas systématiquement la nature des fragments sur les figures MS/MS, mais nous utiliserons la nomenclature officielle pour décrire les fragments moléculaires dans cette partie.



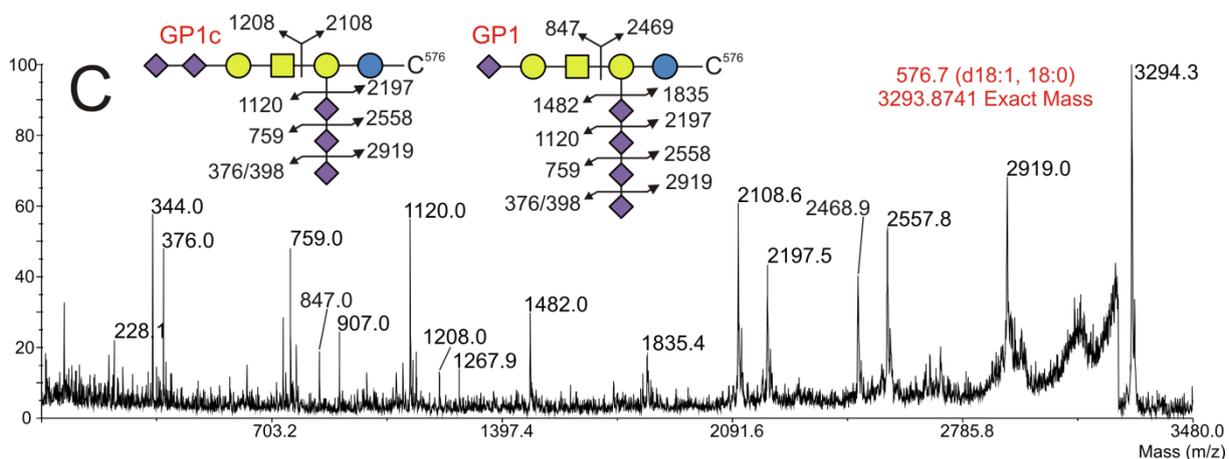


Figure 22 : MS/MS des GSL perméthylés du cerveau du ZF Adulte :

Les spectres MS/MS A, B et C sont issus respectivement de la fragmentation des signaux MS : 2602, 2964 et 3294 m/z. Les spectres MS/MS correspondent aux GSL suivant : (A) GT1b et GT1c, (B) GQ1c, (C) GP1c et GP1d.

A - Le spectre A montre les fragments des Gg de type GT1b et GT1c composés de 3 acides sialiques (2 Neu5Ac et 1 Neu5Gc). Les 3 positions possibles du Neu5Gc sur le GT1b ont pu être déterminées grâce aux fragments $Y_{2\alpha}$, $B_{1\beta}$ et $B_{2\beta}$. Ces mêmes fragments ont également permis d'identifier un Gg de type GT1c possédant un Neu5Gc en position 2 sur son Gal-(II).

B - Le spectre B illustre la fragmentation du GQ1c ayant un Neu5Gc en position terminale sur son Gal-(II) et son Gal-(IV). En analysant l'intensité du fragment $Y_{2\alpha}$ de ces 2 molécules, il semblerait que le GQ1c dominant porte son Neu5Gc en position terminale sur le Gal-(II).

C - Le spectre C correspond à deux structures isobariques de GP1 portant 5 Neu5Ac réparti respectivement en 3/4 unités sur le Gal(II) et en 2/1 unités sur le Gal-(IV). Les fragments $Y_{2\alpha}$, $B_{1\beta}$ permettent de mettre en évidence la présence de ces deux structures.

A.3.2.2.2 Les GSL du Cœur :

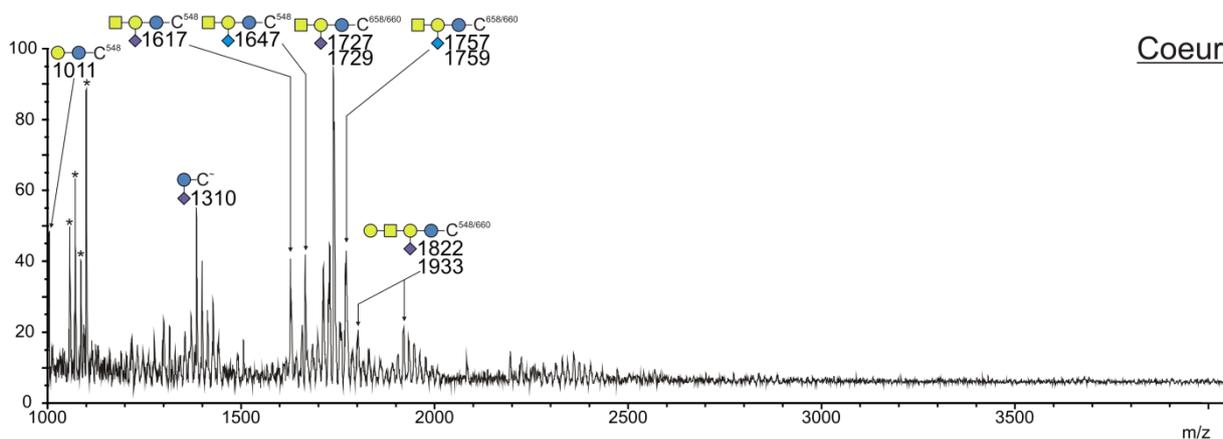


Figure 23 : MALDI-TOF des GSL perméthylés du cœur du poisson zèbre adulte.

Les GSL perméthylés du cœur sont dominés par des gangliosides de type GM4, GM2 et GM1 associés à des céramides de type d18:1-C16:0, d18:1-C24:1 et d18:1-C24:0 avec une préférence pour les céramides avec un AG long de type C24. Les gangliosides sont sialylés par des motifs Neu5Ac et Neu5Gc. Le LacCer (d18:1-C16:0) est présent à environ 50% de l'intensité maximale du signal et se manifeste sous le signal à 1011 m/z.

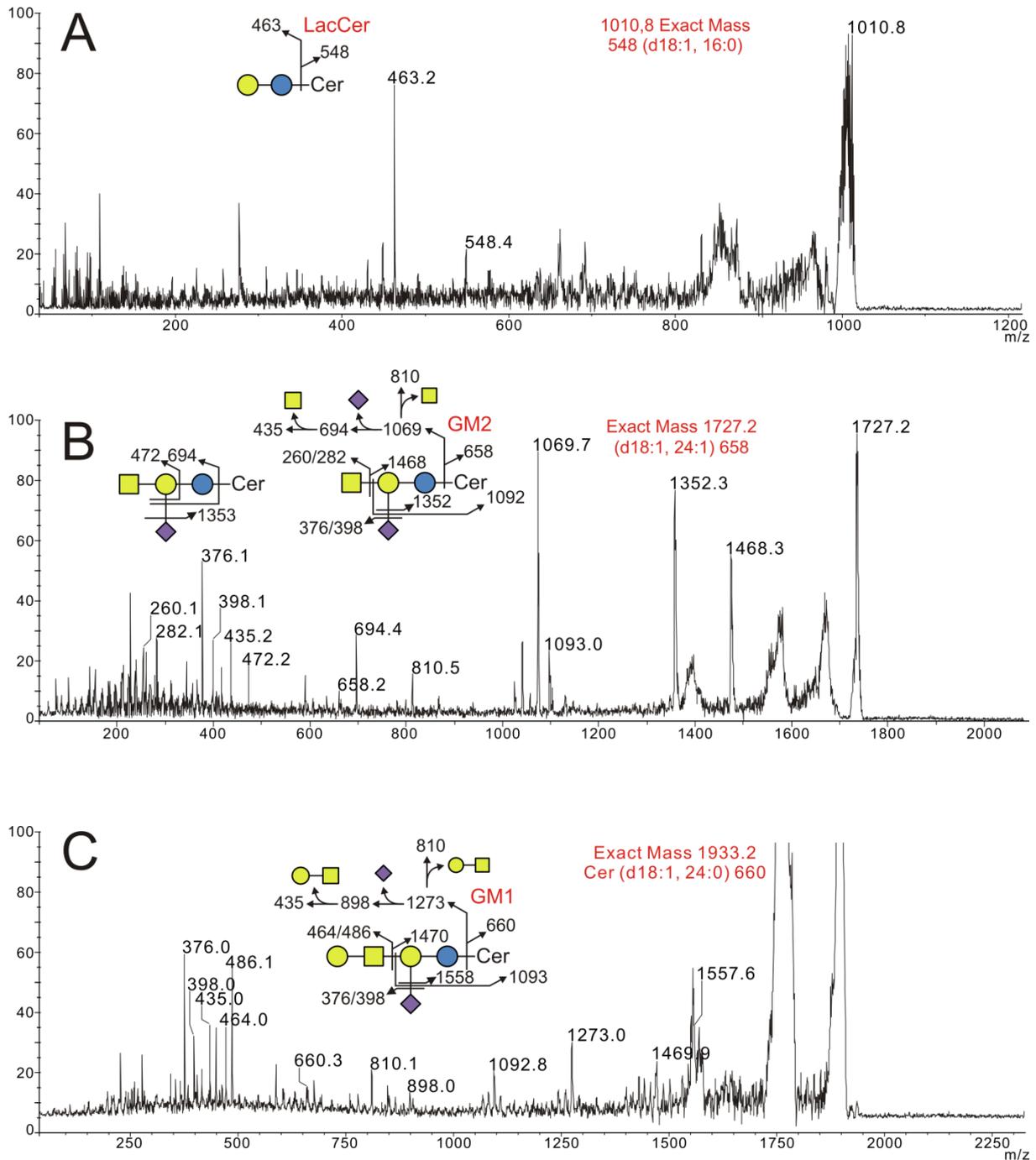


Figure 24 : MS/MS des GSL perméthylés du cœur du ZF Adulte :

Les spectres MS/MS A, B et C sont issus respectivement de la fragmentation des signaux MS : 1011, 1727 et 1933 m/z. Les spectres MS/MS correspondent aux GSL suivant : (A) LacCer, (B) GM2, (C) GM1.

A - Les fragments du spectre A de type Z_0/C_2 illustre la présence d'un LacCer possédant une base sphingoïde de type d18:0/C16:0 correspondant à un fragment sans adduit de 548 m/z.

B - Le Spectre B montre les fragments primaires et secondaires caractéristiques d'un Gg de type GM2. Les fragments secondaires $Y_2\alpha-C_0$ (810 m/z) et tertiaires $Y_2\beta-C_0$ (694 m/z) sont clairement visibles. Le fragment Z_0 à m/z 658 sans adduit correspond à un céramide de type C18:1-C24:1.

C - Le spectre C de fragmentation MS/MS correspond à un GM1a. Une fois encore, les fragments secondaires $Y_2\alpha-C_0$ (810 m/z) et $Y_2\beta-C_0$ (898 m/z) sont clairement visibles. Le fragment Z_0 à m/z 660 sans adduit correspond à un céramide de type C18:1-C24:0.

A.3.2.2.3 Les GSL des Branchies :

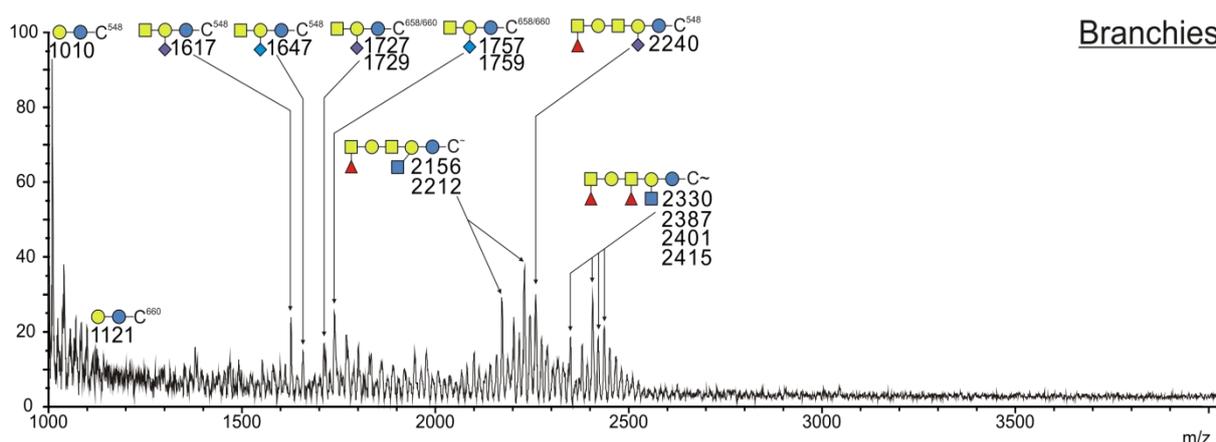


Figure 25 : MALDI-TOF des GSL perméthylés des branchies du poisson zèbre adulte.

Les GSL des branchies dévoilent une distribution intéressante dominée par les LacCer et constituée de gangliosides et de structures lacto/ganglio acides et neutres. Les structures sialylées ne sont pas majoritaires et nous observons un nombre important de lacto/ganglio neutres, qui ont une partie glycanique composée de un à deux résidus de fucose positionnés sur les HexNAc-(V) et/ou HexNAc-(III). La partie céramide utilise un large éventail d'AG et différentes bases sphingoïdes dans leurs constitutions. Cependant, le LacCer de type d18:1-C16:0 (1011 m/z) reste la structure majoritaire des GSL de branchies.

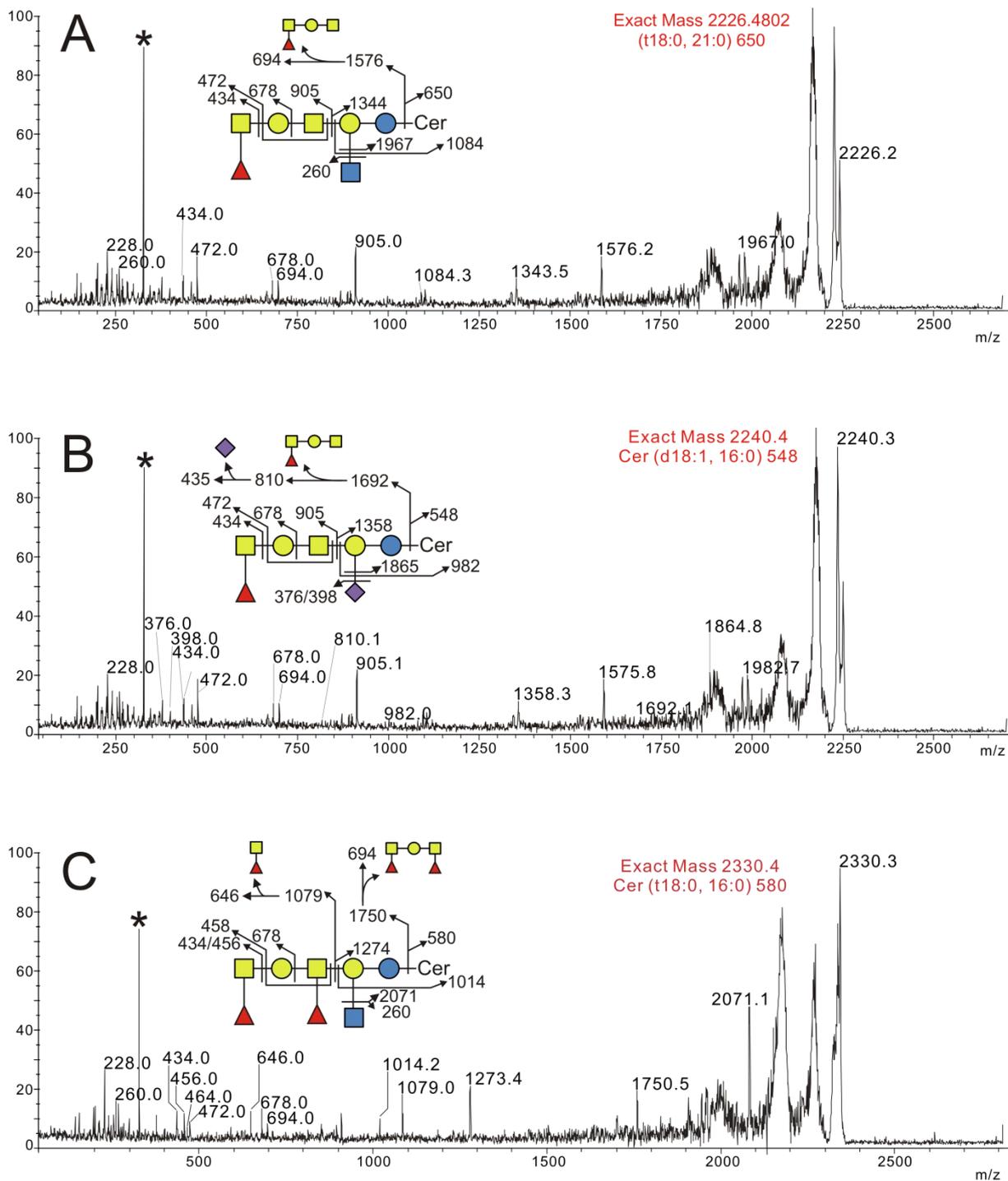


Figure 26 : MS/MS des GSL perméthylés des branchies du ZF Adulte :

Les spectres MS/MS A, B et C sont issus respectivement de la fragmentation des signaux MS : 2226, 2240 et 2330 m/z.

Le symbole * représente un contaminant.

B - Le spectre B correspond à un fucosyl-*N*-acétyl-galactosaminyl-GM1, que nous avons identifié sur un céramide de type d18:1-C16:0 (548 m/z). Le fragment C₃ de cette molécule est particulièrement intéressant puisque sa présence au sein d'une structure R-Gal-GalNAc-R est en faveur d'une liaison en β1-3 et d'une série Gg. Une molécule similaire a été identifiée dans les reins de *Oncorhynchus keta* (Saumon du Pacifique) (Niimura, Tomori et al. 1999) et

correspond à la molécule suivante : $\text{Fuca}\alpha\text{1-3GalNAc}\beta\text{1-3Gal}\beta\text{1-3GalNAc}\beta\text{1-4[Neu5Ac}\alpha\text{2-3]Gal}\beta\text{1-4Glc}\beta\text{1-1Cer}$.

A/C - Les spectres A et C correspondent à des structures de la série Lacto-Ganglio (LcGg) composées de un à deux résidus de fucoses qui n'ont pour l'instant jamais été rapportées dans la littérature. Il est pour l'instant impossible de préciser la nature des HexNAc et des liaisons qui composent ces molécules. Les structures fucosylées des spectres A et C semblent être structurellement proches de la structure du spectre B. Nous avons représenté les structures A et B sur la base de cette observation.

A.3.2.2.4 Les GSL du Foie :

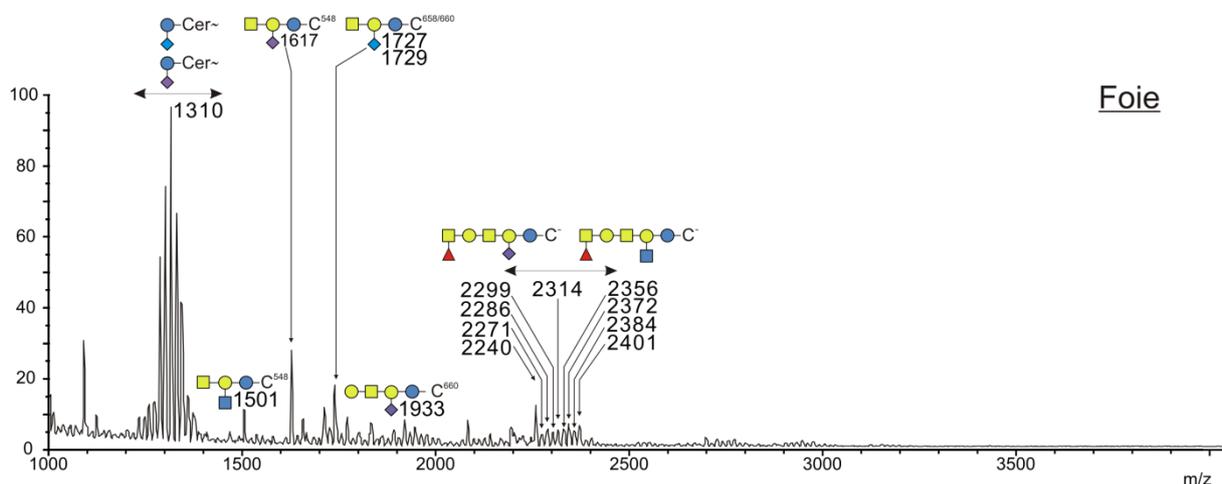
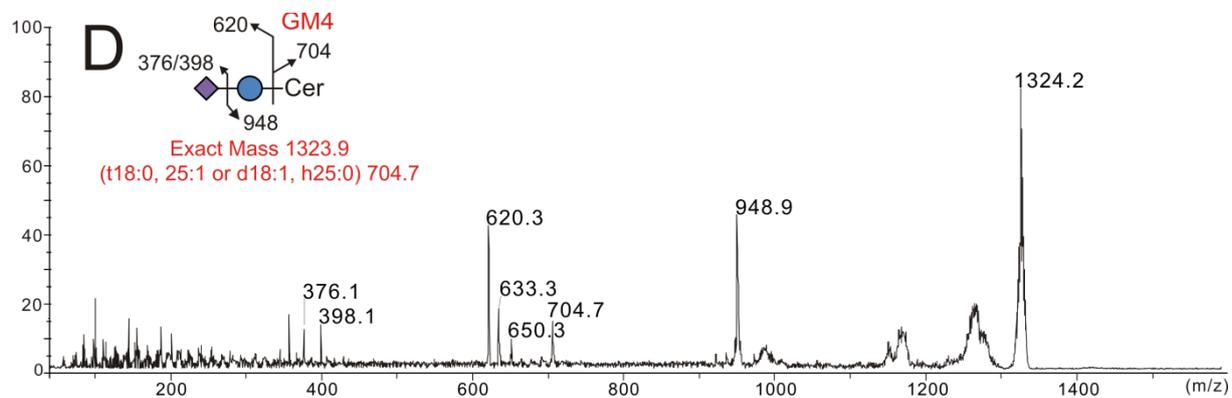
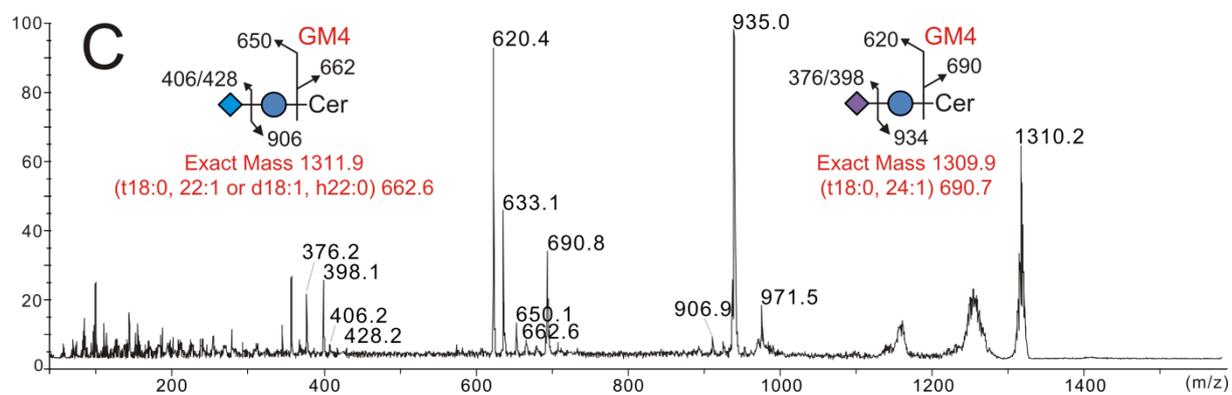
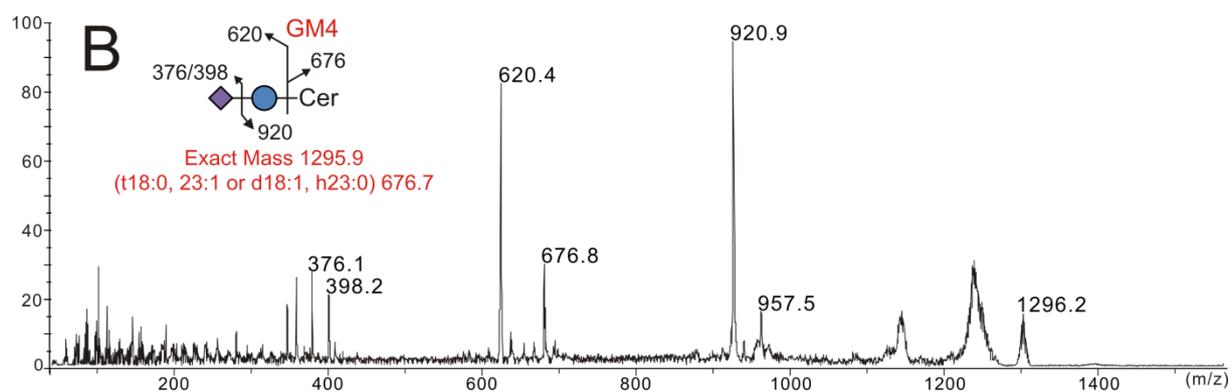
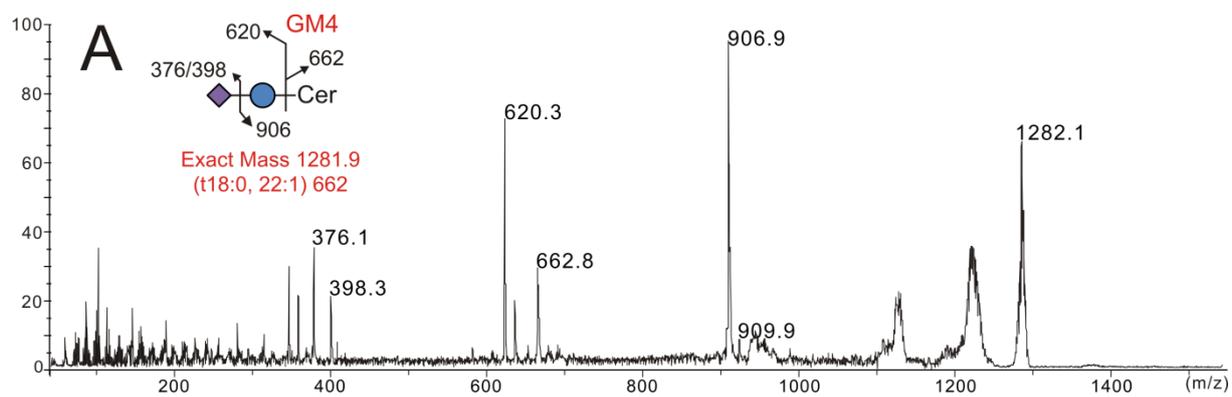


Figure 27 : MALDI-TOF des GSL perméthylés du foie du poisson zèbre adulte.

Les GSL hépatiques sont constitués très majoritairement par des gangliosides GM4 (Neu5Ac et Neu5Gc) supportés par de nombreux céramides différents. La présence de bases lipidiques diversifiées a également été observée au niveau des HexCer. Dans les structures minoritaires, nous observons des gangliosides acides (GM2 et GM1) et la série lacto-ganglio acides et neutres allant de 2299 à 2401 m/z.

Il est étonnant de voir que les GSL découverts dans le foie du poisson zèbre adulte sont différents des GSL de la lignée cellulaire ZFL que nous avons précédemment étudiée. Ces différences s'expliquent par le fait que la lignée cellulaire ZFL ne représente qu'un seul type de cellule, alors que le foie se compose de plusieurs types cellulaires.



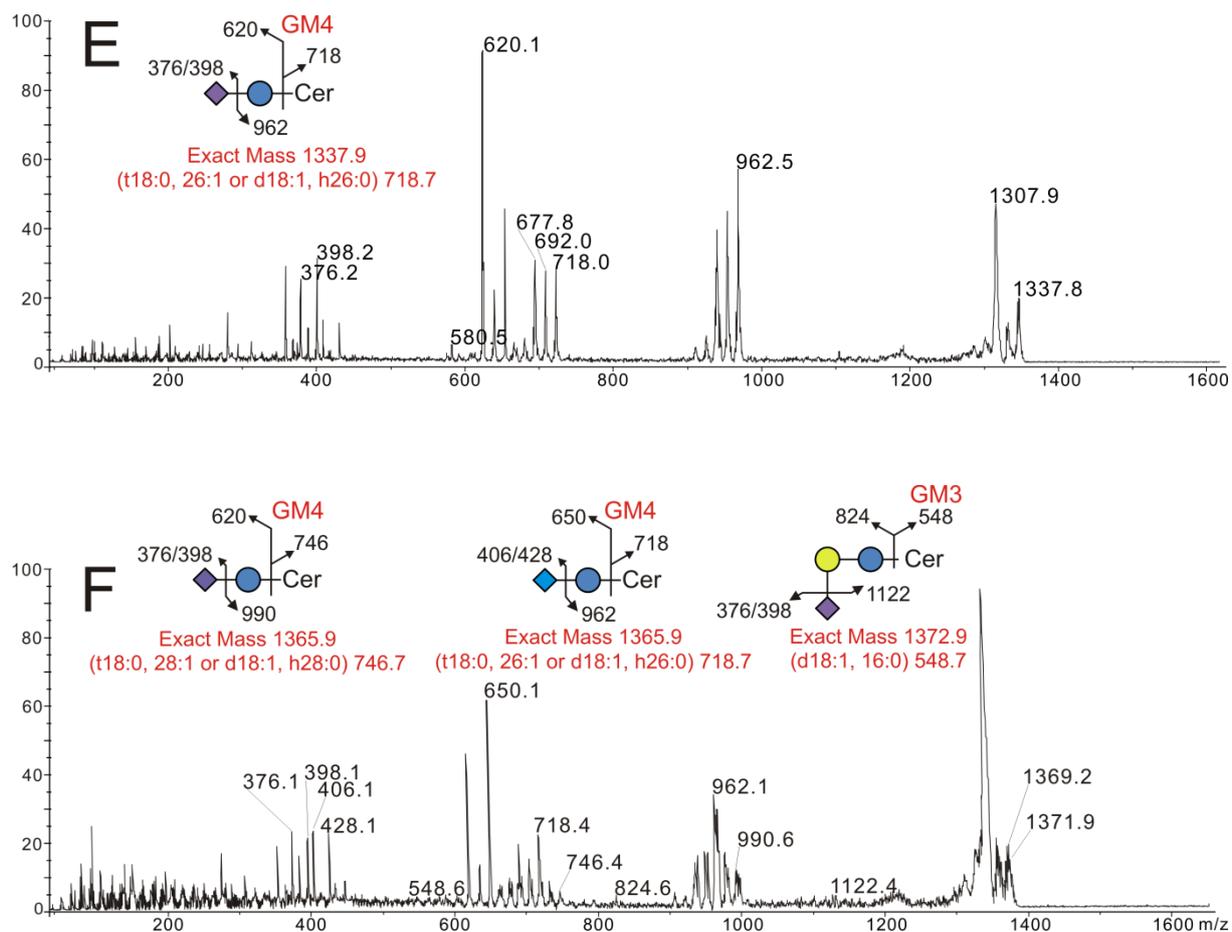


Figure 28 : MS/MS des GSL perméthylés du foie du ZF Adulte

Les spectres MS/MS A, B et C sont issus respectivement de la fragmentation des signaux MS : 1282, 1296, 1310, 1324, 1338 et 1366 m/z. Les spectres MS/MS correspondent tous aux GM4 sauf le spectre F qui correspond à un mélange de GM4 et de GM3.

A-F / L'ensemble des spectres représentent une importante série de GM4 constituée de bases lipidiques diverses et d'un GM3 constitué d'une base céramide classique de d18:1-C16:0. Il semble que la majorité des structures GM4 soient sous la forme de Neu5Ac-GlcCer au vu des expériences de GCMS et de MS/MS. La nature des bases lipidiques du GM4 est extrêmement variable et de constitution inhabituelle.

A.3.2.2.5 Les GSL des Intestins :

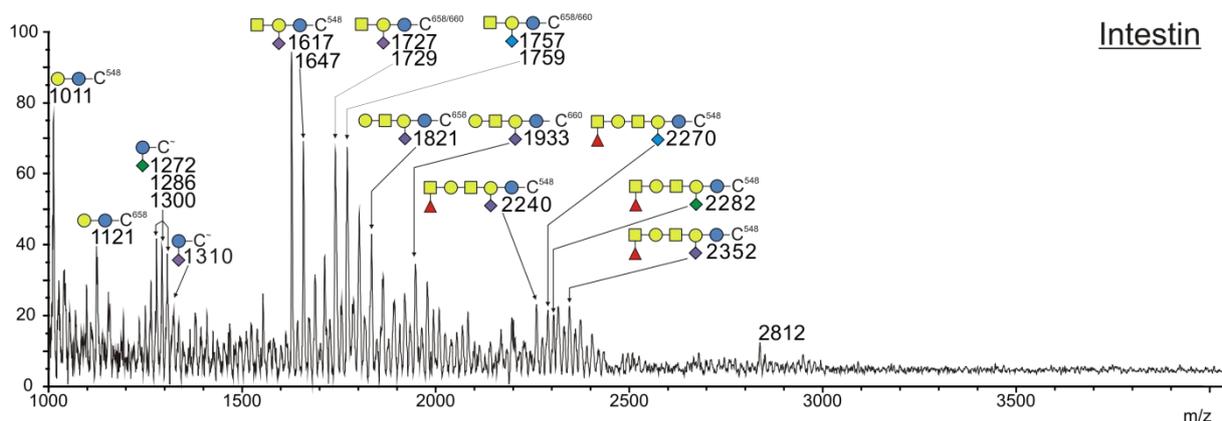
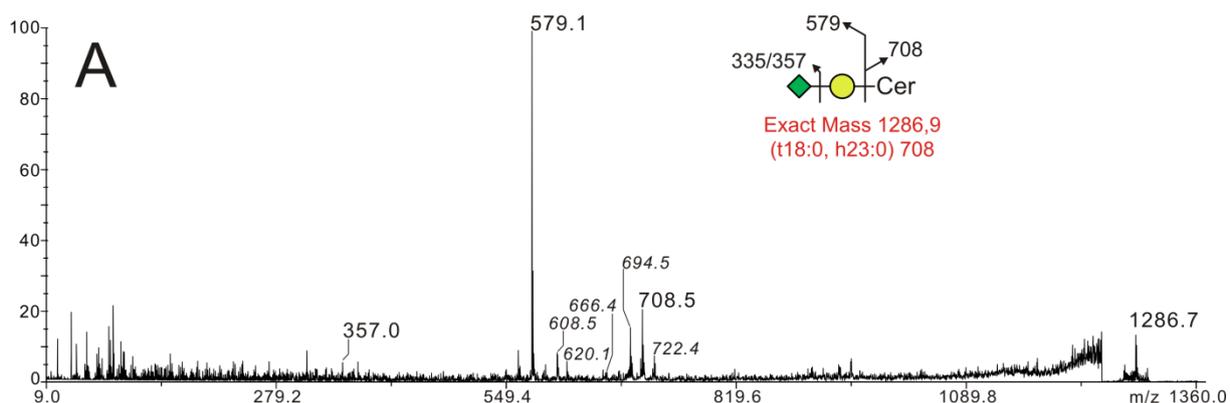


Figure 29 : MALDI-TOF des GSL perméthylés de l'intestin du poisson zèbre adulte.

Les GSL intestinaux présentent une majorité de gangliosides de type GM4, GM2 et GM1 substitués par de l'acide sialique de type Neu5Ac, Neu5Gc et KDN. Nous avons observé du KDN aussi bien dans les gangliosides GM4 que dans les structures lacto-ganglio acides. Cette observation corrèle avec la découverte de la dre2-CMAS ([Schaper, Bentrop et al. 2012](#)) qui est une enzyme cytosolique responsable de l'activation du KDN en CMP-KDN qui peut sous cette forme être incorporé aux glycoconjugués par les ST. Cependant, l'origine du KDN libre et cytosolique dans les cellules intestinales du ZF adulte est un mystère. Les deux principales hypothèses sont les suivantes : soit le ZF peut synthétiser lui-même du KDN, soit il recycle du KDN d'une source exogène (alimentaire ou bactérienne). A l'heure actuelle aucun rapport n'indique que le ZF soit capable de bio-synthétiser du KDN et la nourriture distribuée aux poissons, que nous avons testée, ne contient pas de KDN.



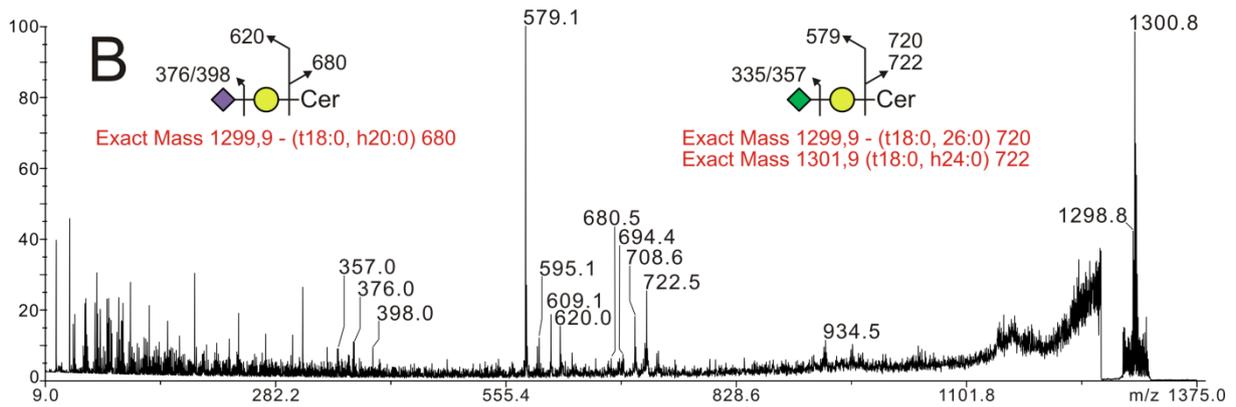


Figure 30 : MS/MS des GSL perméthylés des Intestins du ZF Adulte :

Les spectres MS/MS A et B sont issus respectivement de la fragmentation des signaux MS : 1286 et 1300 m/z. Les spectres MS/MS correspondent tous a du GM4.

A-B / les gangliosides de type GM4 des intestins du poisson zèbre adulte portent des acides sialiques de type KDN que nous avons pu mettre en évidence grâce aux fragments C_2 correspondant au glycanne entier et aux fragments B_1/C_1 correspondant à l'acide sialique uniquement.

A.3.2.2.6 Les GSL de la Peau :

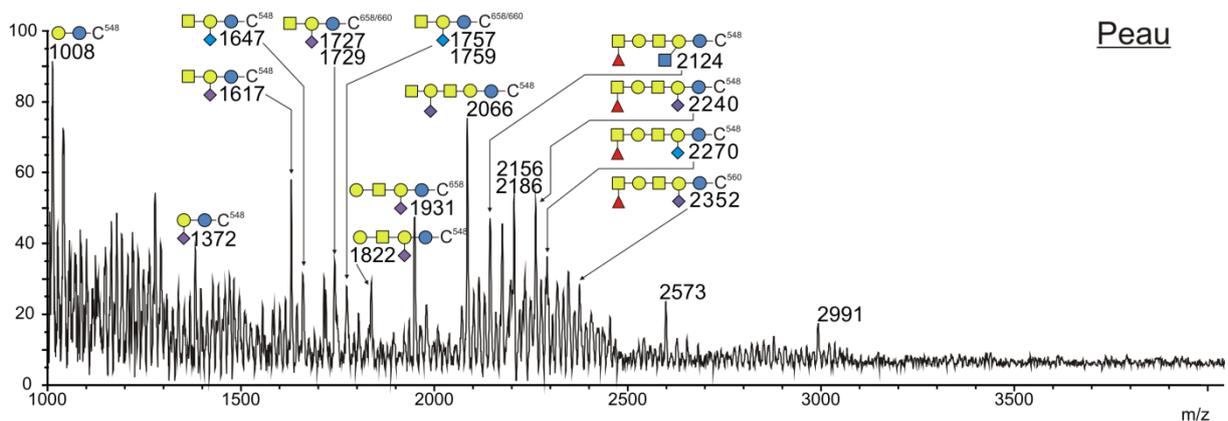


Figure 31 : MALDI-TOF des GSL perméthylés de la peau du poisson zèbre adulte.

La peau est un organe extrêmement riche en GSL qui assure un rôle de barrière protectrice vis-à-vis des agents pathogènes et d'isolement de l'organisme vis-à-vis du milieu extérieur. Nous observons dans cet organe un profil de GSL composés de structures acides sous forme de gangliosides (GM2 et GM1) et de lacto-ganglio acides portant un fucose.

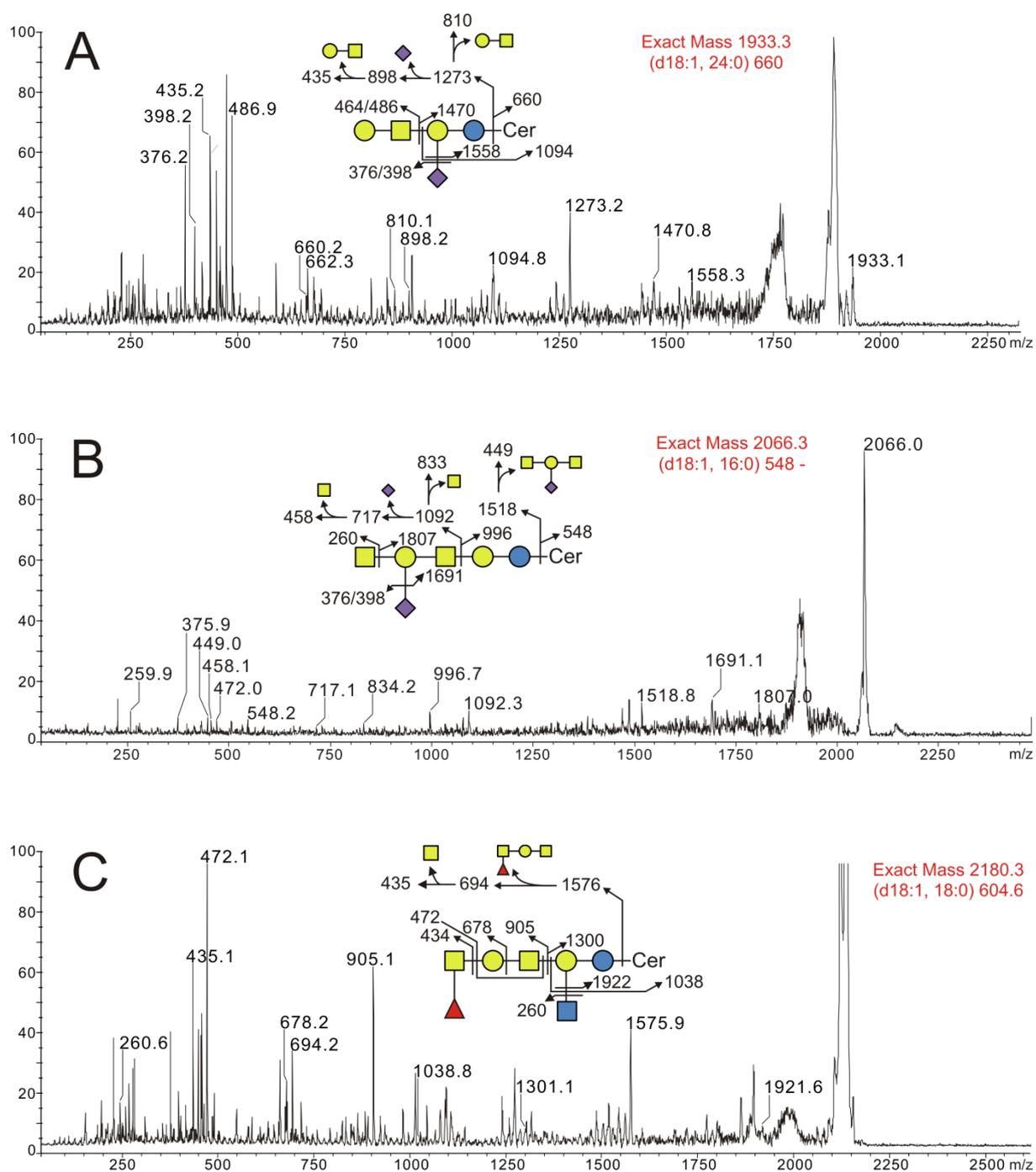


Figure 32 : MS/MS des GSL perméthylés de la peau du ZF Adulte.

Les spectres MS/MS A, B et C sont issus respectivement de la fragmentation des signaux MS : 1933, 2066 et 2180 m/z. Les spectres MS/MS correspondent aux GSL suivant : (A) GM1b, (B) *N*-Acétylgalactosaminy-GM1b, (C) GSL de la série LcGg.

A.3.2.2.7 Les GSL des Testicules :

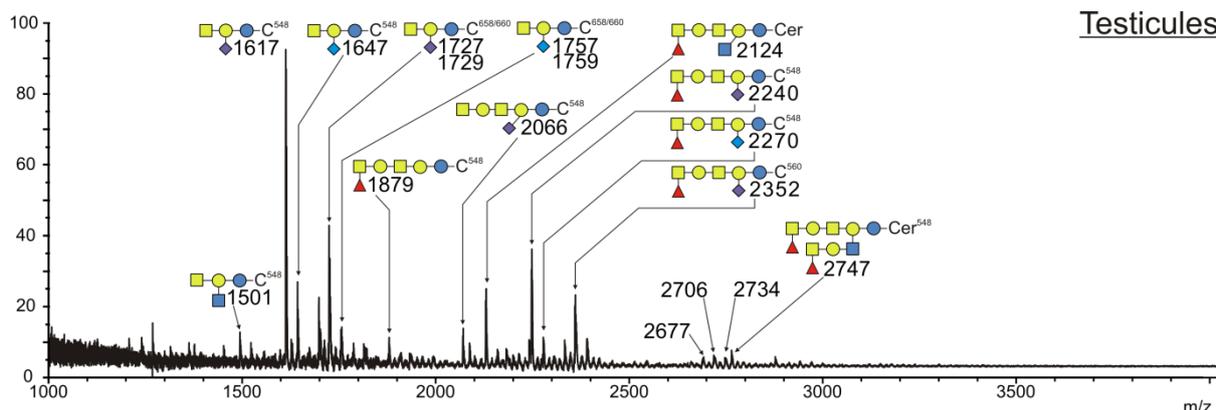
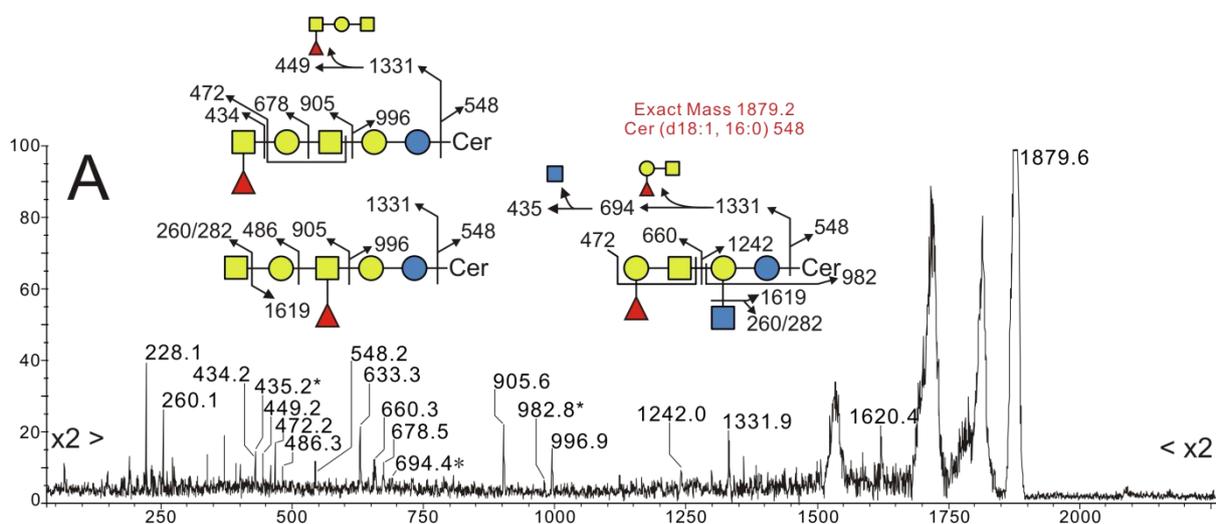


Figure 33 : MALDI-TOF des GSL perméthylés des testicules du poisson zèbre adulte.

Les GSL présentent un nombre restreint de céramides et de structures glycaniques. Seuls les céramides d18:1-C16:0, d18:1-C24:1 et d18:1-C24:0 sont observés dans cet organe. Les structures glycaniques identifiées sont celles du GM2 (Neu5Ac et Neu5Gc) et des lacto-ganglio acides et neutres présentant des résidus de fucose. L'originalité structurales des glycosphingolipides de testicules réside dans la présence de structures mono-fucosylées (1879 m/z) et di-fucosylées (2747 m/z). Il a été rapporté chez la souris que seuls les GSL fucosylés étaient impliqués dans le processus reproductif puisqu'une souris *Siat9^{-/-}* (GM3 synthèse) est fertile, alors qu'une souris *Galgt1^{-/-}* (GA2, GM2, GD2 synthèse) est infertile ([Sandhoff, Geyer et al. 2005](#)).



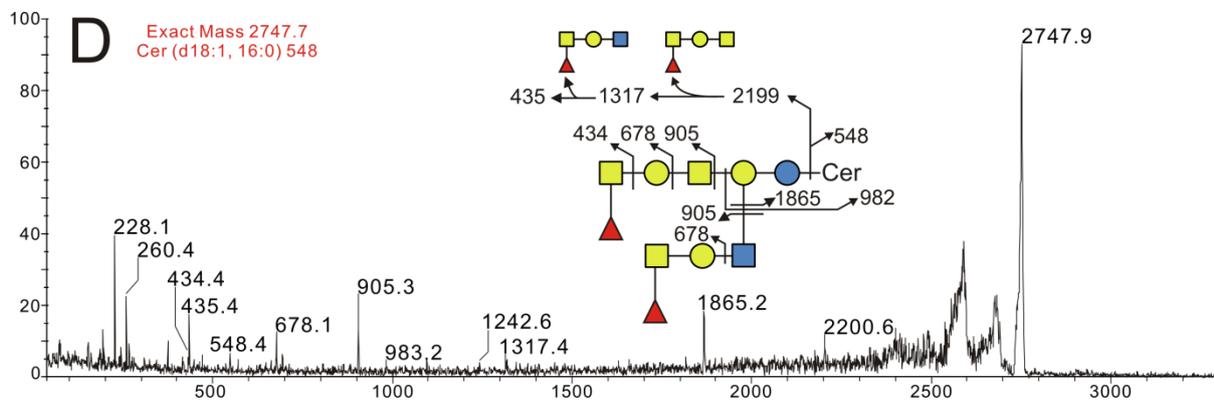
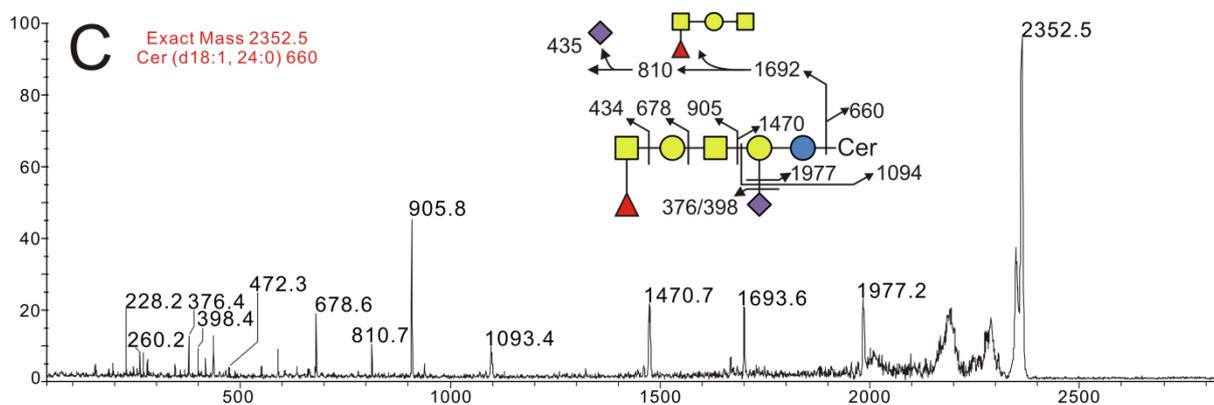
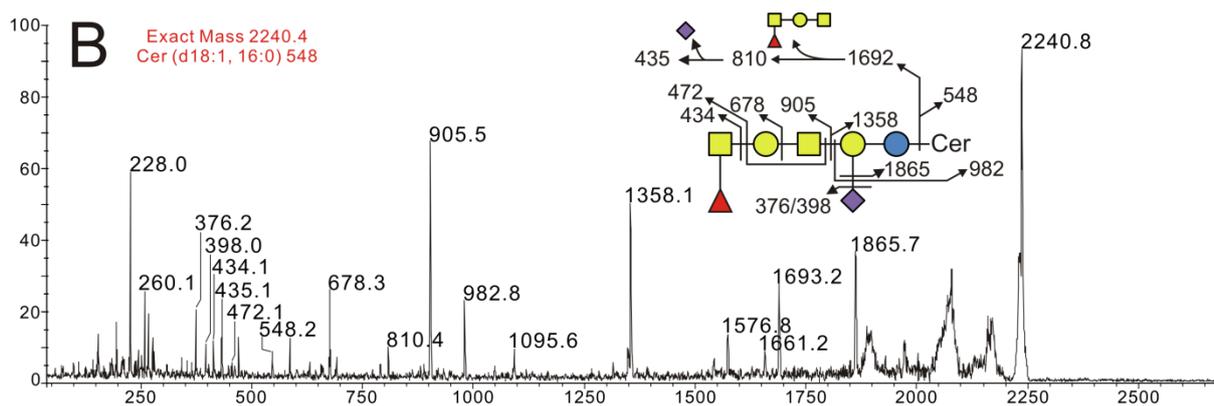


Figure 34 : MS/MS des GSL perméthylés du testicules du ZF Adulte.

Les spectres MS/MS A, B, C et D sont issus respectivement de la fragmentation des signaux MS : 1979, 2240, 2352 et 2747 m/z.

A-D / Les spectres illustrés montrent les structures les plus originales des testicules du ZF adulte et notamment les structures des spectres A et D sont uniquement retrouvées dans les testicules du ZF et qui n'ont pour l'instant jamais été rapportées dans la littérature.

A.3.2.2.8 Les GSL des Ovaires :

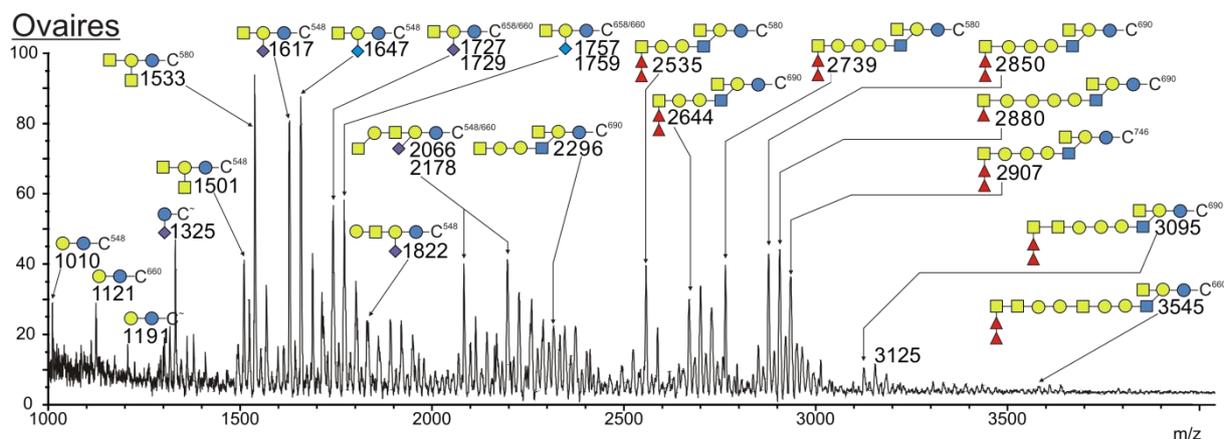
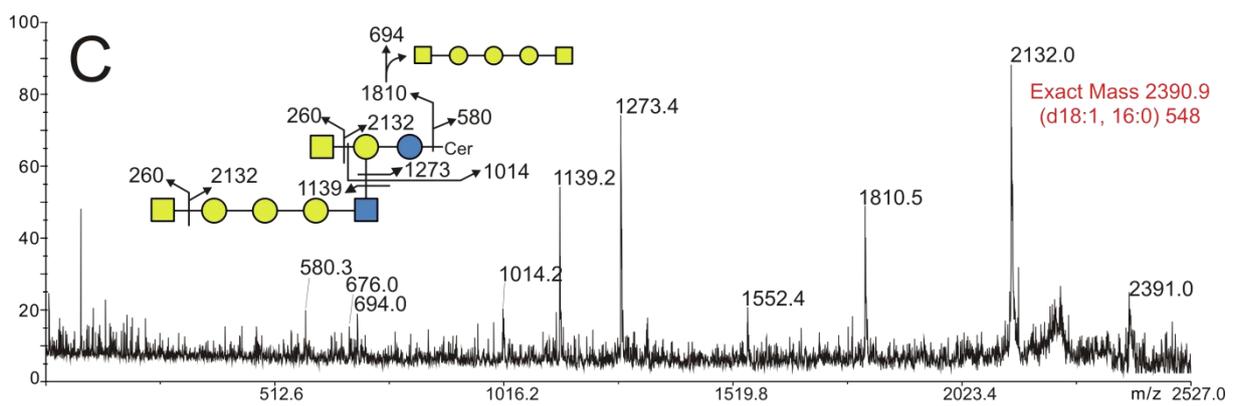
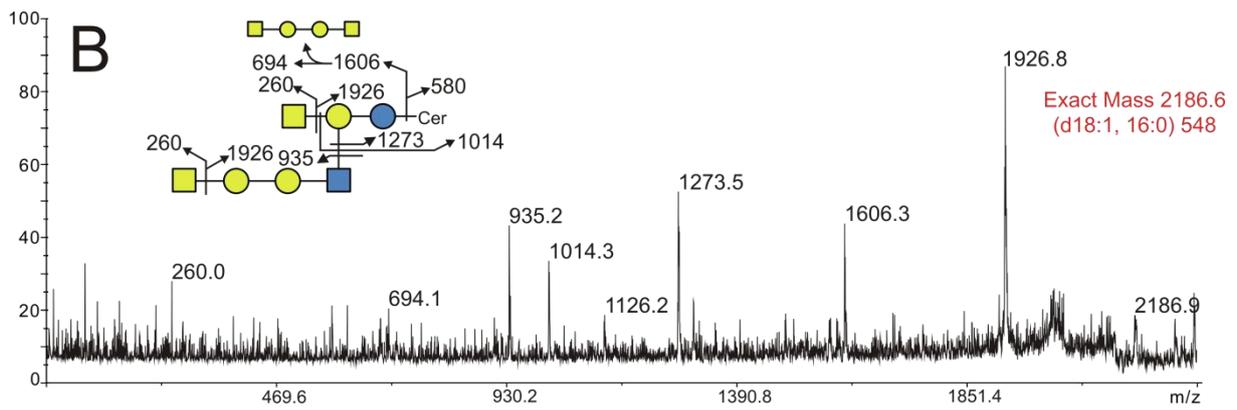
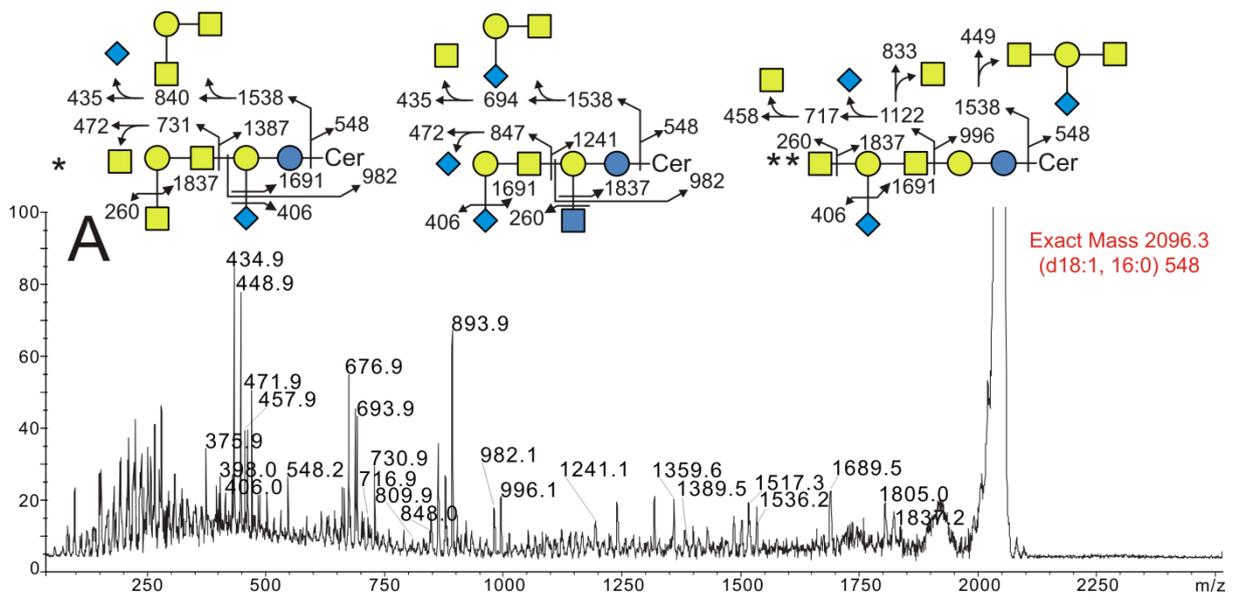


Figure 35 : MALDI-TOF des GSL perméthylés des ovaires du poisson zèbre adulte.

Le profil total des GSL ovariens est particulièrement intéressant, puisqu'il présente des structures complètement atypiques et nouvelles constituées de deux fucoses consécutifs. De plus, ce profil peut être séparé en deux familles distinctes: d'un côté les structures acides « classiques » (GM4, GM2, GM1 et lacto-ganglio) constituées en majorité par des céramides communs de type d18:1-C16:0 (548 Da), d18:1-C24:1 (658 Da) et d18:1-C24:0 (660 Da); et d'un autre côté des structures lacto-ganglio neutres qui utilisent principalement des céramides complexes de type t18:0-C16:0 (580 Da) et t18:0-C24:0 (690 Da). Certains GSL neutres d'ovaires portent des motifs di-HexNAc (3095 et 3545 Da) et des séquences Hex-Hex -probablement Gal-Gal- pouvant aller jusqu'à 3 résidus de Gal (2983 Da) que l'on ne trouve que dans les GSL ovariens. La présence d'oligo-fucoses au sein des glycoconjugués des êtres vivants est particulièrement rare et n'est rapportée que dans les O-glycannes ([Khoo, Sarda et al. 1995](#)), les glycosphingolipides ([van Die, van Stijn et al. 2010](#)) et les oligosaccharides libres du parasite *Schistosoma mansoni* ([Robijn, Koeleman et al. 2007](#)). Une série de quatre GSL neutres, très similaires aux GSL neutres d'ovaire, a été décrite en 1988 dans le foie de *Parophrys vetulus* (Sole anglaise) incluant la structure suivante: Fuca1-3GalNAcβ1-3Galα1-3Galβ1-4GlcNAcβ-3(GalNAcβ1-4)Galβ1-4Glcβ1-1Cer, qui nous a servi de référence pour établir la séquence des GSL neutres d'ovaire. Néanmoins, les GSL neutres de la sole sont légèrement différents puisqu'ils sont moins complexes et ne présentent qu'un seul résidu de fucose.



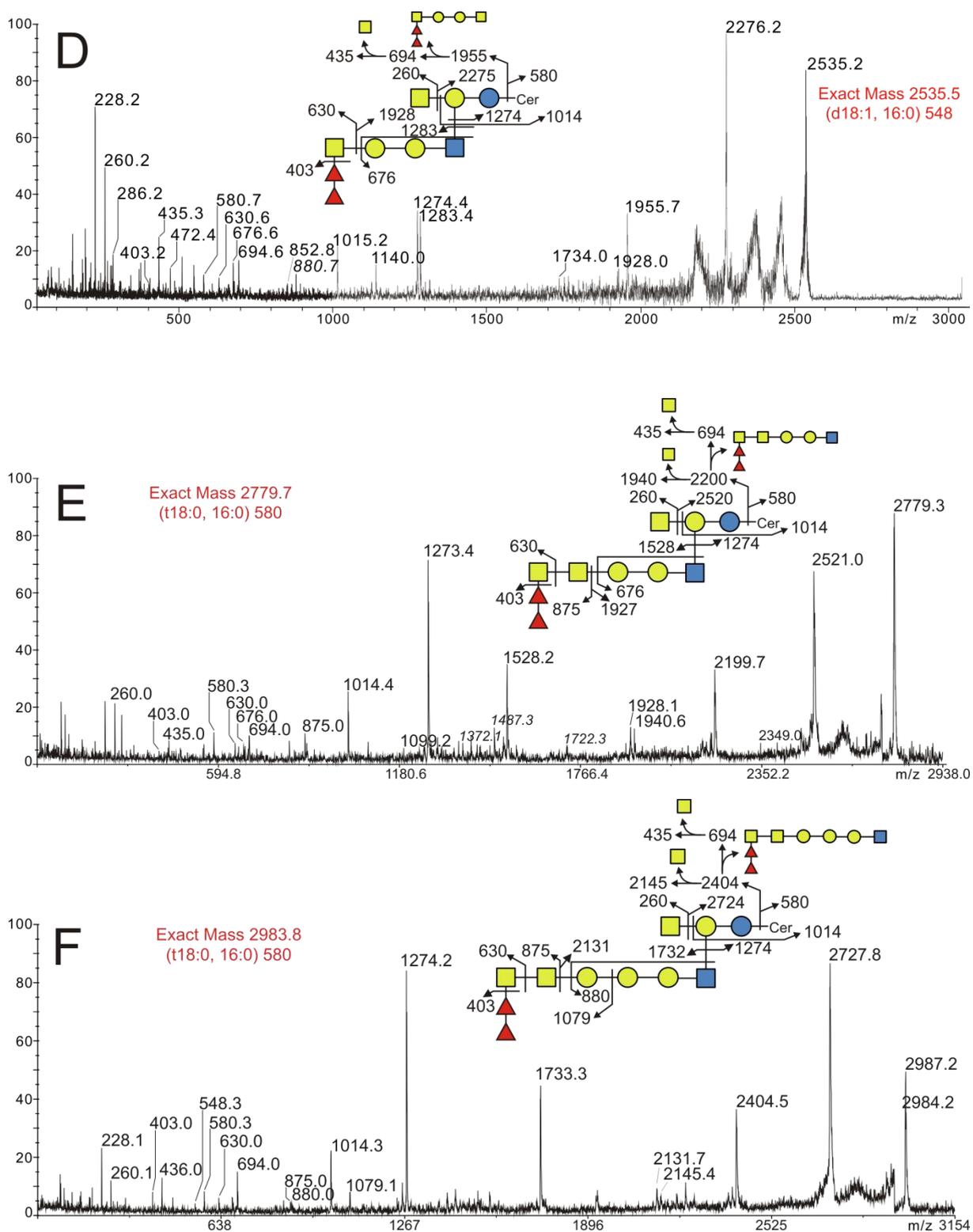


Figure 36 : MS/MS des GSL perméthylés des ovaires du ZF Adulte :

Les spectres MS/MS A, B, C, D, E et F sont issus respectivement de la fragmentation des signaux MS : 2096, 2186, 2390, 2535, 2779 et 2983 m/z.

A-F / les spectres MS/MS des ovaires montrent les structures caractéristiques que nous avons découvertes. C'est notamment le cas pour la série lacto-ganglio qui présente des structures di-fucosylées ainsi que tous ses précurseurs de biosynthèse non-fucosylés. Les

structures di-fucosylées ont majoritairement un céramide de type phytosphingosine : t18:0-C16:0 (580 Da) ou t18:0-C24:1 (690).

Afin de mieux comprendre la distribution structurale des GSL di-fucosylés au sein des ovaires, nous avons réalisé une analyse sur trois échantillons distincts : le tissu de soutien des ovocytes (tissu conjonctif), les ovocytes (non fécondés) et les embryons ; ces échantillons ont été récupérés par dissection ou par collecte.

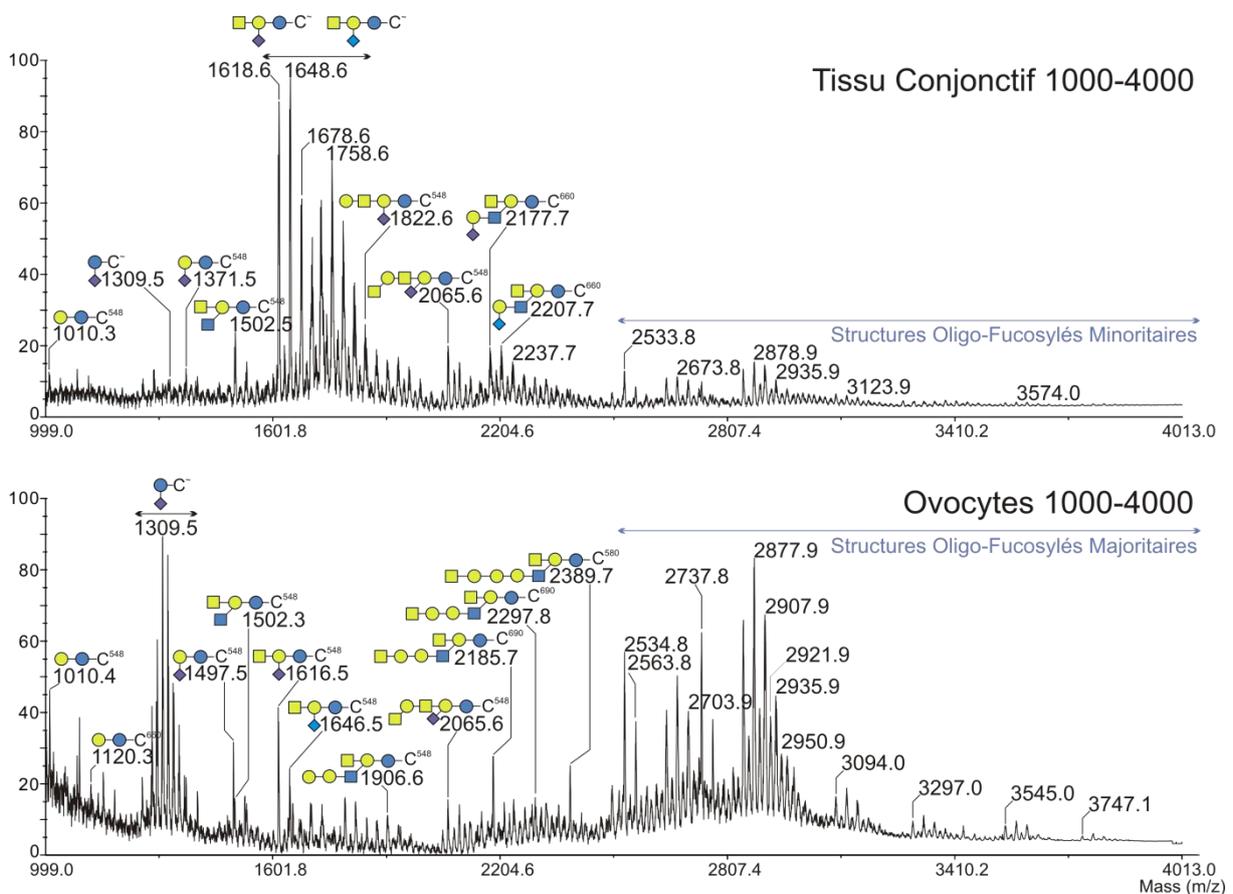


Figure 37 : MALDI-TOF des GSL perméthylés du tissu conjonctif et des ovocytes de l'ovaire du ZF adulte.

La séparation des principaux tissus ovariens par dissection a permis de distinguer précisément la répartition des GSL de l'ovaire. Nous observons que le tissu conjonctif de l'ovaire contient la très grande majorité de gangliosides GM2, quasiment aucun GM4 et une quantité très réduite de structures oligo-fucosylées. Au contraire, les ovocytes contiennent une importante quantité de GM4 et de structures oligo-fucosylées dans des proportions similaires qui correspondent aux proportions observées chez les GSL totaux de l'ovaire. Nous constatons la présence très réduite du GM2 dans les GSL des ovocytes et de l'ensemble des structures neutres non-fucosylées à l'origine de la synthèse des structures oligo-fucosylées. Il convient cependant d'être relativement prudent sur les observations des structures mineures puisque celles-ci pourraient provenir d'une contamination croisée des échantillons

lors de leur dissection. Néanmoins, les différences observées sont suffisamment franches pour établir la localisation tissulaire des GSL ovariens. Nous avons réalisé une analyse des GSL des embryons à 6 hpf (*hours post fertilization*) pour visualiser l'évolution des GSL des ovocytes non fécondés au cours du développement embryonnaire du poisson zèbre.

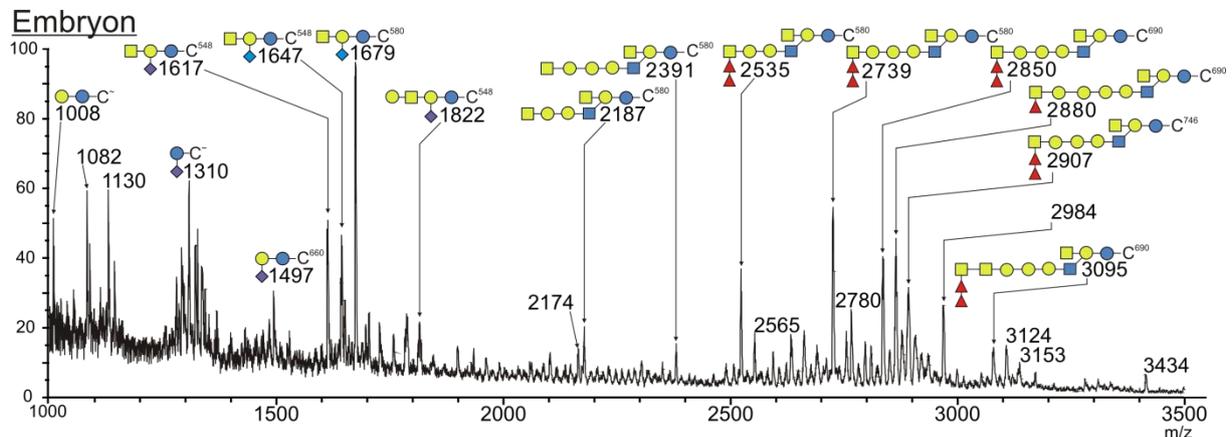


Figure 38 : MALDI-TOF des GSL perméthylés des embryons (6 hpf) du ZF.

Les GSL embryonnaires à 6 hpf (*hour post fertilization*) présentent des structures lacto-ganglio neutres oligo-fucosylés identiques aux ovocytes non fécondés. Les GSL d'embryons présentent moins de structures GM4 et plus de structures GM2 avec une proportion importante de Neu5Gc par rapport aux ovocytes non fécondés. De plus, le GM2 majoritaire contient du NeuGc et un céramide de type t18:0-C16:0. Les GSL oligo-fucosylés sont donc transmissibles et pourraient avoir un rôle important lors des processus biologiques de reproduction ou de développement.

A.3.2.3 Purification des GSL oligo-fucosylés des ovaires :

Nous avons focalisé notre attention sur les GSL oligo-fucosylés des ovaires que nous avons préalablement identifiés sur les profils de MS par fragmentation en MS/MS. Afin de les analyser précisément, nous avons cherché dans un premier temps à les purifier. Pour ce faire, nous avons adapté une technique de purification sur colonne de silice à nos échantillons et utilisé le gradient suivant pour éluer nos GSL totaux.

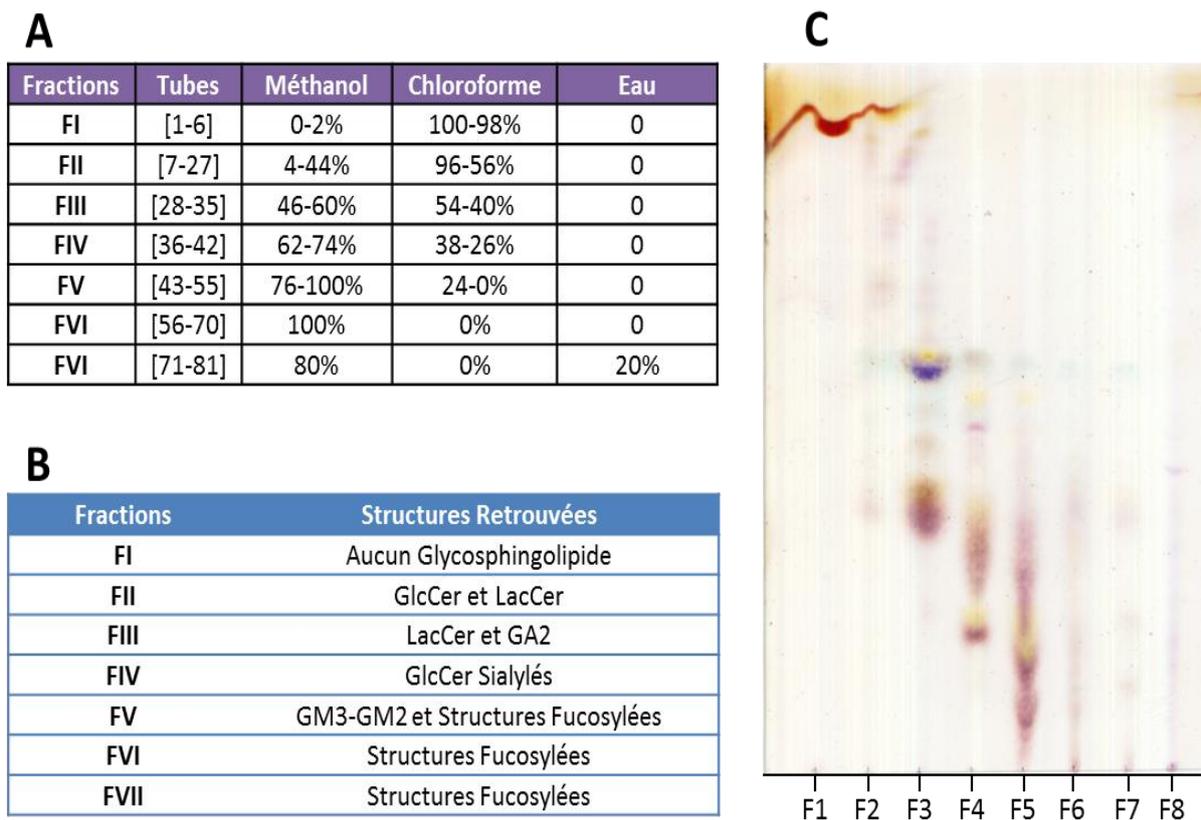


Figure 39 : Séparation et Purification des GSL d'ovaires sur une colonne de silice.

Les GSL d'ovaires ont été élués sur une colonne de silice à un débit de 3 mL/min grâce à des gradients de solvants spécifiques composés de méthanol, de chloroforme et d'eau, qui sont résumés dans le tableau (A). Le Tableau (B) indique la composition des GSL que nous avons identifiés dans chaque fraction grâce à des analyses en MS. La figure (C) est une chromatographie sur couche mince (CCM) réalisée sur l'ensemble des fractions que nous avons collectées, ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 55:35:5). L'orcinol sulfurique à 20% est le révélateur utilisé pour colorer les glycanes.

Suite à la séparation des GSL d'ovaires par chromatographie *flash*, nous avons analysé les différentes fractions par MS (*cf.* Figure 40) après perméthylation. Ainsi, nous avons pu identifier les GSL isolés des ovaires par rapport aux analyses MS/MS effectuées sur les GSL des ovaires totaux. Les fractions récoltées ont toutes été identifiées : F1 aucun GSL ; FII HexCer et LacCer ; FIII LacCer et GA2 ; FIV HexCer Sialylés ; FV gangliosides, lacto-ganglio sialylés et quelques structures oligo-fucosylées, FVI structures oligo-fucosylées. Nous avons donc réussi à isoler les GSL oligo-fucosylés d'intérêts dans la fraction VI pour les analyser. Cette séparation chromatographique a également servi à éliminer dans le chloroforme les AG libres présents initialement dans l'échantillon.

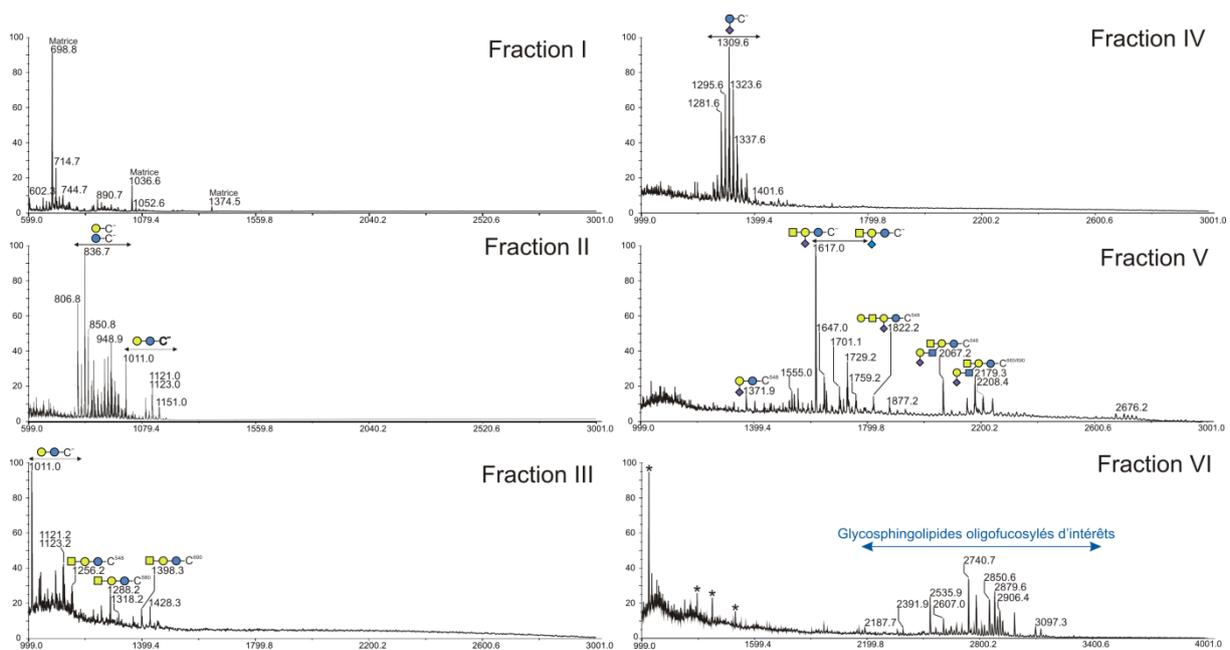


Figure 40 : Analyses des fractions de GSL d'ovaires issues de la purification sur colonne de silice par MS. 5 % des fractions collectées ont été perméthylées et analysées par spectrométrie de masse pour déterminer leurs compositions respectives en GSL. Le nom des fractions (F1-F6) fait directement référence à la figure 39.

Nous avons ensuite utilisé une digestion enzymatique par l'endoglycocéramidase-II afin de libérer la partie glycanique des GSL oligofucosylés que nous avons purifiés et analysés par MS après perméthylation. Les résultats MS de la digestion des GSL oligofucosylés de la fraction VI montrent que la réaction enzymatique et la purification ont bien fonctionné. En effet, les masses retrouvées correspondent bien aux structures glycaniques isolées des GSL oligofucosylés et les analyses MS/MS ont également permis de confirmer les structures des oligosaccharides identifiés. Cette technique nous a donc permis de confirmer les séquences des structures oligo-fucosylées et leurs purifications nous permettent d'augmenter la sensibilité de leurs analyses.

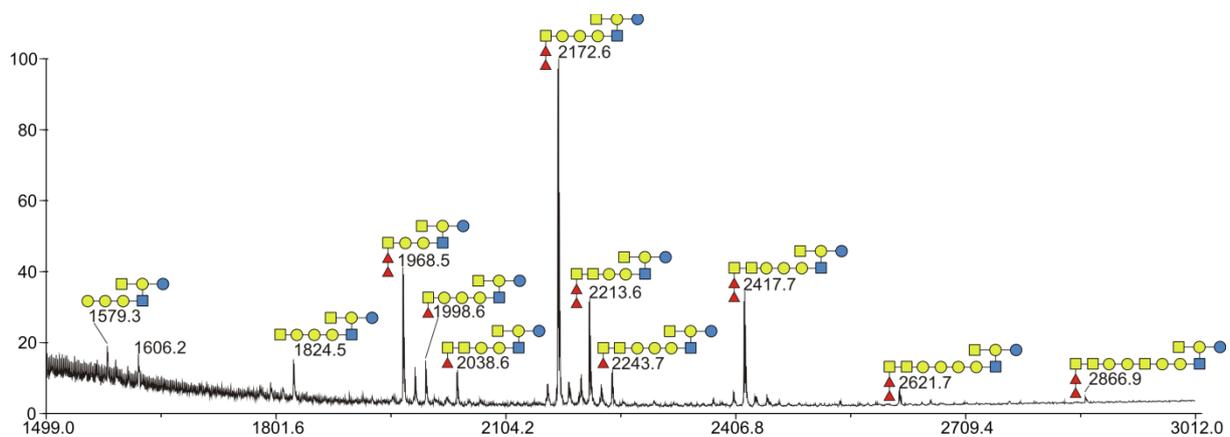


Figure 41 : MALDI-TOF des oligosaccharides perméthylés et isolés des GSL oligo-fucosylés. Les glycannes des GSL purifiés d'ovaires ont été libérés par endocéramidase-II et perméthylés pour être analysés par MS et MS/MS. Les résultats obtenus reflètent parfaitement les résultats décrits sur les GSL entiers.

Nous avons ensuite voulu poursuivre ces analyses structurales par une caractérisation de ces oligosaccharides par RMN sur un spectromètre 900 MHz. Malheureusement, les quantités de matériel extrêmement faibles ne nous ont pas permis d'obtenir des informations structurales par cette technique. Nous avons alors tenté de réaliser un alditol-acétate partiellement méthylé et acétylé pour obtenir des informations sur les liaisons glycaniques de ces structures. Les quantités restant néanmoins critiques lors des dérivations chimiques, nous n'avons obtenu que des informations partielles qu'il nous faudra encore confirmer. Parmi celles-ci, une fragmentation caractéristique d'une liaison Fuc-Fuc en α 1-2 a pu être identifiée sur le chromatogramme et nous renseigne sur le type d'enzyme impliqué dans la biosynthèse de cette structure. Il nous faudra poursuivre l'analyse de ces structures pour déterminer précisément la nature de ces molécules en accumulant plus de matériel.

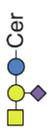
A.3.2.4 Tableau récapitulatif des structures de GSL du ZF Adulte :

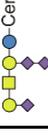
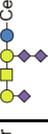
Tableau 7 : Illustration de l'ensemble des structures identifiées dans le ZF adulte

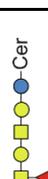
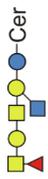
Les structures décrites dans le tableau suivant sont basées sur les observations MS et MS/MS. Un code couleur permet de distinguer les structures minoritaires (Rouge Clair) et les structures majoritaires (Rouge Foncé) des GSL du ZF adulte. Les valeurs d'intensité relative sont données en pourcentage pour chaque structure identifiée par rapport à l'intensité maximale sur un spectre MS observé dans la gamme de masse de 1000-4000 Da. Les * présents à côté des masses totales représentent le type d'acide sialique présent sur la structure : 0* uniquement du Neu5Ac, 1* au moins 1 Neu5Gc et 2* au moins 1 KDN. Les abréviations correspondent aux termes suivants : SPH (Base sphingoïde) ; AG (Acide Gras) ; STR (Structure).

Séries	Types	Céramides		Exact Mass		STR	Cerveau	Cœur	Gill	Foie	Intestin	Peau	Ovaire	Testis
		SPH	AG	Cer	Total									
LacCer	LacCer	d18:1	C16:1	546	1008,7	 Cer	100,0	x	100,0	x	60,0	85,5	x	x
			C16:0	548	1010,8		28,0	13,7	x	10,2	100,0	32,6	20,8	11,6
			C18:1	574	1036,8		x	x	x	x	61,3	x	x	x
			C18:0	576	1038,8		x	x	x	x	45,9	x	x	x
			C22:3	626	1088,8		x	x	x	10,5	x	x	x	x
			C22:0	632	1094,8		x	93,0	21,7	x	x	x	x	x
			C24:1	658	1120,9		x	12,4	9,5	x	53,4	36,1	31,9	x
			C24:0	660	1122,9		x	12,7	15,7	9,4	43,7	x	26,1	x
	t18:0	C24:1	676	1139,9	x		x	x	8,9	x	x	x	x	

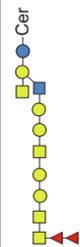
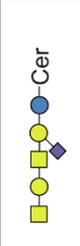
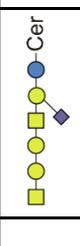
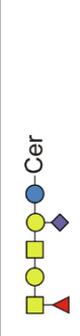
Ganglioside			C24:0	690	1152,9		x	x	22,1	x	x	x	x	x
			C26:0	720	1182,9		x	x	23,5	x	x	x	x	x
	GA1	d18:1	C16:0	548	1460,0		x	x	12,7	x	x	x	x	10,3
			C18:2	572	1484,0		x	10,0	x	x	x	x	x	x
			C22:0	632	1544,1		x	x	12,5	x	x	x	x	x
			C24:0	692	1604,1		x	x	11,0	x	x	x	x	x
	GM4-Ac	t18:0	C22:1	662	1281,9		x	12,2	x	56,0	x	x	x	x
			C23:1	676	1295,9		x	20,3	x	76,6	x	x	x	x
			hC20:0	680	1299,9		x	x	x	x	12,4	x	x	x
			C24:1	690	1310,0		x	18,5	x	100,0	14,7	x	x	x
			hC22:0	694	1314,0		x	x	x	x	14,7	x	x	x
			C25:1	704	1324,0		x	10,4	x	68,1	x	x	x	x
			hC26:1	718	1338,0		x	8,9	x	42,5	x	x	x	x
			C26:1	746	1366,0		x	x	x	9,9	x	x	x	x
	GM4-Gc	t18:0	C22:1	662	1312,0*		x	x	x	45,0	x	x	x	x
			C23:1	676	1326,0*		x	x	x	x	12,0	x	x	x
			hC20:0	680	1329,0*		x	x	x	x	19,2	x	x	x
			C28:1	718	1368,0*		x	x	x	10,0	x	x	x	x
			hC24:0	722	1372,0*		x	x	x	x	16,6	x	x	x
	GM4-KDN	t18:0		694	1272,9**		x	x	x	x	40,8	x	x	x
			hC23:0	708	1286,9**		x	x	x	9,4	47,4	x	x	x
				722	1301,0**		x	x	x	x	35,8	x	x	x
			C27:0	734	1313,0**		x	x	x	x	15,6	x	x	x
			hC26:0	750	1329,0**		x	x	x	x	19,1	x	x	x
	GM3	d18:1	C16:0	548	1372,0		x	35,9	16,4	9,0	16,9	52,2	x	12,5
			C16:0	548	1401,9*		x	x	x	x	11,1	x	x	x

			C22:0	632	1456,0		x	x	10,6	x	4,4	x	x	x
			C24:1	658	1482,0		x	x	x	x	3,0	x	x	x
			C24:0	660	1484,0		x	x	x	x	x	42,1	x	x
		t18:0	C16:1	578	1401,9		x	x	x	x	11,1	x	x	x
			C16:0	580	1404,0		x	x	x	x	6,7	x	x	x
			hC18:0	638	1462,0		x	x	x	x	11,0	x	x	x
			C22:1	662	1486,0		x	x	x	x	10,0	x	x	x
			C23:1	676	1500,0		x	x	x	6,4	x	x	x	x
			C26:0	720	1544,1		x	x	12,5	x	x	x	x	x
GD3	d18:1	C18:0	576	1761,1		5,3	x	x	x	x	x	x	x	
GT3	t18:0	C18:0	576	2123,3		17,4	x	x	x	x	x	x	x	
				2153,3*	7,6	x	x	x	x	x	x	x	x	
GM2	d18:1	C16:0	548	1617,1		x	39,4	23,8	28,2	78,1	95,0	92,2	100,0	
				1647,1*		x	18,4	15,1	7,9	49,7	44,0	100,0	31,1	
		C22:0	632	1701,2		x	37,0	17,4	10,3	x	56,1	x	x	
		C24:1	658	1727,2		x	100,0	21,7	18,2	x	x	35,8	x	
				1757,2*		x	41,9	x	5,8	x	x	40,5	x	
		C24:0	660	1729,2		x	41,9	17,1	16,4	55,3	100,0	62,7	56,1	
				1759,2*		x	x	19,9	8,7	50,8	84,8	59,1	24,4	
		GM1	d18:1	C16:0		548	1821,2		x	x	14,4	7,1	28,8	48,1
1851,2*	x				x		11,9		x	20,8	x	x	x	
C24:0	660			1933,2	x	12,7	15,0		x	24,6	82,6	x	x	
				1963,2*	x	x	14,8		x	21,1	51,0	x	x	
t18:0	C18:0		576	1850,2	24,8	x	x		x	x	x	x	x	
	C20:0		636	2270,4	x	x	x		x	x	60,5	x	x	

			C22:1	662	2296,4		x	x	x	x	x	59,6	x	x	
			C23:1	676	2310,5		x	x	x	x	x	38,7	x	x	
			C24:1	690	2324,5		26,8	x	x	x	x	53,0	x	x	
			C26:1	718	2352,5		10,8	x	x	x	x	x	x	x	
	GD1a	d18:0	C18:0	576	2210,3		21,4	x	x	x	x	x	x	x	x
			C22:0	632	2266,4		x	x	x	x	x	54,3	x	x	
			C24:0	660	2294,5		x	x	x	x	x	21,4	x	x	
			C26:0	688	2322,5		x	x	x	x	x	22,3	x	x	
		t18:0	C20:0	636	2270,4		x	x	x	x	x	19,4	x	x	
			C22:1	662	2296,4		x	x	x	x	x	26,7	x	x	
			C23:1	676	2310,5		x	x	x	x	x	20,4	x	x	
	GD1b	d18:1	C16:0	548	2182,3		x	x	x	x	x	x	x	x	
			C18:0	576	2210,3		21,4	x	x	x	x	x			
	GT1	t18:0	C18:0	576	2572,5		62,0	x	x	x	x	x	x	x	x
					2602,2*		23,8	x	x	x	x	x	x	x	x
	GQ1	t18:0	C18:0	576	2933,7		93,1	x	x	x	x	x	x	x	x
					2963,7*		36,9	x	x	x	x	x	x	x	x
	GP1	t18:0	C18:0	576	3294,8		16,3	x	x	x	x	x	x	x	x
					3324,8*		4,8	x	x	x	x	x	x	x	x
	GH6	t18:0	C18:0	576	3655,8		6,5	x	x	x	x	x	x	x	x
LcGg	Neutres	d18:1	C16:0	548		1501,0	x	x	x	x	x	x	43,5	14,9	
						1705,1	x	x	x	x	x	x	x	22,8	
		t18:0	C16:1	578	1531,1		x	x	x	x	x	x	97,5	x	

1Fuc		C16:0	578	2186,4		x	x	x	x	x	x	17,4	x
		C24:1	690	2254,3		x	x	x	x	x	x	16,5	x
		C26:0	720	2284,3		x	x	x	x	x	x	17,0	x
		C28:0	748	2312,4		x	x	x	x	x	x	18,0	x
		C16:0	580	2390,5		x	x	x	x	x	x	x	9,8
	d18:1	C16:0	548	1879,2		x	x	x	x	x	x	x	16,8
				2124,3		x	x	x	x	x	x	x	25,4
		C18:0	604	2180,3		x	x	x	x	x	55,9	x	x
	t18:0	C16:0	580	2156,3		x	x	31,6	x	x	x	x	x
		hC16:0	610	2186,3		x	x	25,6	x	x	43,5	x	x
		C19:0	622	2198,4		x	x	20,8	x	x	x	x	x
		C20:0	636	2212,4		x	x	39,9	x	x	x	x	x
		C21:0	650	2226,4		x	x	25,7	x	x	x	x	x
		C22:0	664	2240,4		x	x	21,5	x	x	83,0	x	x
		C23:0	678	2254,5		x	x	19,0	x	5,3	x	x	x
		hC20:0	680	2256,5		x	x	x	x	5,4	x	x	x
		C24:1	690	2266,5		x	x	x	x	5,8	x	x	x
		hC22:0	694	2270,4		x	x	x	5,2	x	x	x	x
		hC23:0	708	2284,4		x	x	x	4,2	x	x	x	x
		C26:0	720	2296,5		x	x	x	x	x	59,6	x	x
hC24:0		722	2298,5	x		x	x	5,0	12,5	39,7	x	x	

2Fuc		hC25:0	736	2312,5		x	x	x	5,2	x	x	x	x	
		C28:0	748	2324,5		x	x	x	x	x	5,1	x	x	
		hC26:0	750	2326,5		x	x	x	6,7	x	x	x	x	
		C16:0	580	2566,6		x	x	x	x	x	x	21,4	x	
		C22:1	662	2646,6		x	x	x	x	x	x	25,7	x	
		C22:0	664	2648,6		x	x	x	x	x	x	24,2	x	
		C24:1	690	2674,7		x	x	x	x	x	x	28,2	x	
		C26:0	720	2704,7		x	x	x	x	x	x	25,2	x	
	d18:1	C16:0	548	2747,7			x	x	x	x	x	x	x	8,4
	t18:0	C16:0	580	2330,5			x	x	19,3	x	x	x	x	x
		C18:0	608	2360,5	x		x	11,2	x	x	x	x	x	
		C20:0	636	2386,5	x		x	31,8	x	x	x	x	x	
		C21:0	650	2400,5	x		x	19,2	x	x	x	x	x	
		C23:0	678	2428,6	x		x	16,2	x	x	x	x	x	
		C16:0	580	2535,5		x	x	x	x	x	x	39,4	x	
		C24:1	690	2644,7		x	x	x	x	x	x	25,7	x	
		C26:0	720	2674,7		x	x	x	x	x	x	28,2	x	
		C16:0	580	2779,7		x	x	x	x	x	x	10,2	x	
		C24:0	692	2891,8		x	x	x	x	x	x	15,4	x	
		C16:0	580	2738,6		x	x	x	x	x	x	39,4	x	
		C24:1	690	2848,7		x	x	x	x	x	x	38,4	x	
C26:0		720	2880,8	x		x	x	x	x	x	42,1	x		
C28:1		746	2904,8	x		x	x	x	x	x	26,0	x		
C28:0		748	2906,8	x		x	x	x	x	x	34,6	x		
C16:0	580	2983,8		x	x	x	x	x	x	9,9	x			
C24:0	692	3095,9		x	x	x	x	x	x	8,4	x			

			C24:0	692	3545,1		x	x	x	x	x	x	1,8	x
Extention-Gg	Acide	d18:1	C16:0	548	2066,3		x	8,2	x	x	x	53,4	19,1	13,5
					2096,3*		x	x	x	x	x	x	26,3	x
					2270,0		x	x	x	x	x	x	x	14,6
	Acide et 1Fuc	d18:1	C16:1	546	2238,0		x	x	x	x	5,9	x	x	x
			C16:0	548	2240,0		x	x	25,7	14,5	11,7	83,0	x	43,8
					2270,0*		x	x	x	8,0	x	60,5	x	19,0
			C17:0	562	2254,4		x	x	19,0	x	x	x	x	x
			C18:1	574	2266,4		x	x	x	x	5,8	x	x	x
			C18:0	576	2268,4		x	x	x	x	5,9	x	x	x
			C24:1	658	2350,5		x	x	x	x	11,6	41,5	x	30,6
			C24:0	660	2352,5		x	x	x	8,7	11,7	45,2	x	30,2

A.3.3 Les Glycoprotéines du poisson zèbre :

Les analyses structurales des *N*- et *O*-glycannes ont été principalement réalisées par le Dr Nao Yamakawa de notre équipe de recherche au cours de son Post-Doctorat. Ces données structurales s'intègrent dans le projet de cartographie glycanique du poisson zèbre et nous ne présenterons dans cette partie que les spectres MS des Ng et Og pour chaque organe du ZF adulte. La séquence des structures glycaniques a été déduite des analyses MS et MS/MS. Les acides sialiques ont été identifiés par dérivation au DMB et analysés en fluorescence par HPLC. Les données structurales sont résumées dans deux

tableaux en fin de sous-partie (cf. Tableau 8 et Tableau 9) Les profils glycaniques sous forme de spectres de masse peuvent directement être comparés organe par organe chez l'homme et la souris grâce au livre *Handbook of Glycomics* de RD. Cummings et JM. Pierce. Nous discuterons des points communs et des différences entre ces modèles biologiques de vertébrés.

A.3.3.1 Analyse des acides sialiques des GP :

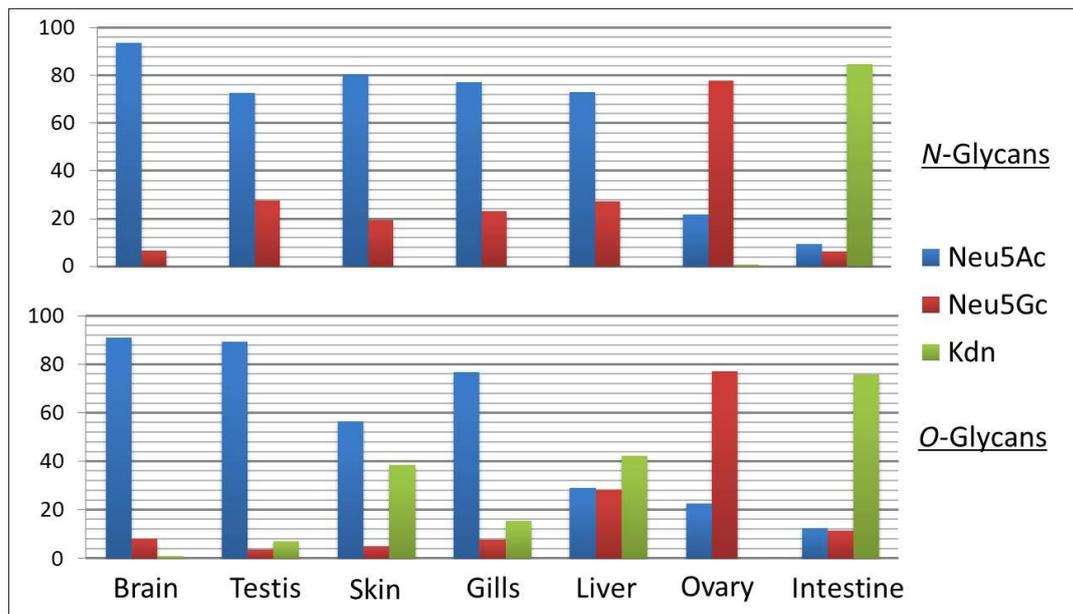
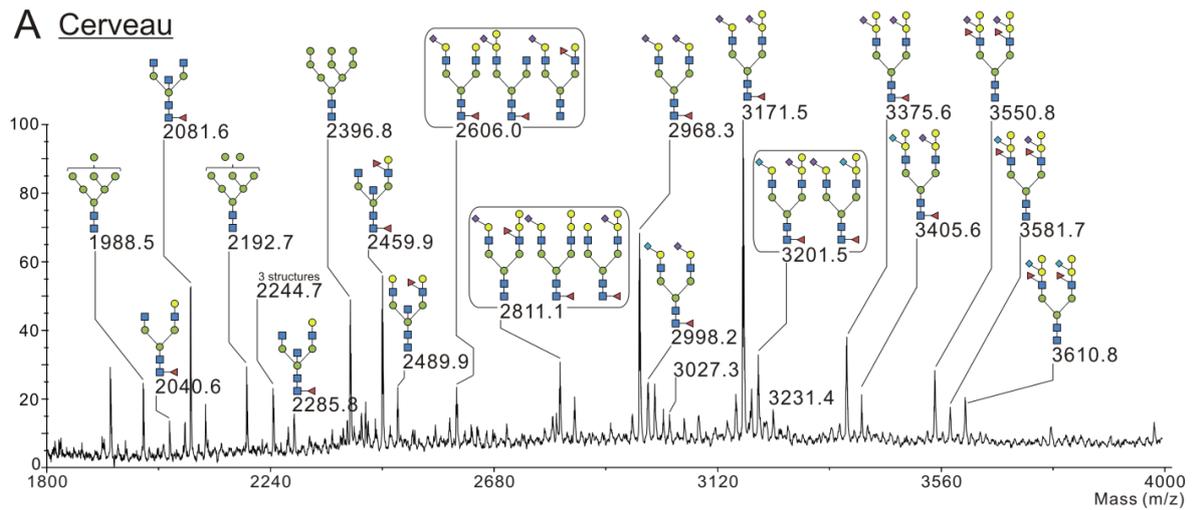


Figure 42 : Quantification relative de l'acide sialique dans les glycoprotéines des organes du ZF adulte. Quantification relative réalisée par HPLC à fluorescence par dérivaison au DMB après hydrolyse douce.

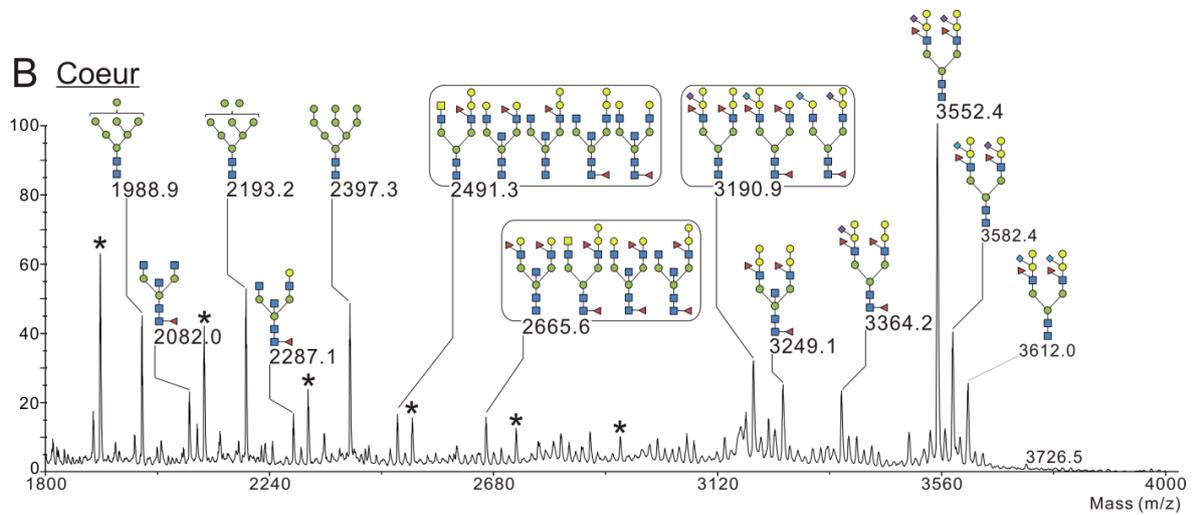
Ces analyses nous permettent d'affirmer que le KDN est bien présent dans les *N*- et *O*-glycannes du poisson zèbre avec un caractère très majoritaire (80%) dans les intestins ; notons que ce pourcentage de KDN correspond parfaitement avec celui des GSL intestinaux. De plus, les intestins sont les seuls organes à exprimer du KDN au niveau leurs Ng puisque la présence de KDN au niveau des Ng dans les autres organes n'a pas été détectée. *A contrario*, le KDN est présent dans les Og de plusieurs autres organes dont la peau et le foie où il est fortement exprimé à hauteur de 40%. Il est néanmoins surprenant de noter que les résultats de quantification par HPLC sont bien supérieurs aux observations de MS. Cette différence pourrait être due à une sensibilité ou une stabilité en MALDI-TOF plus faible des structures constituées de KDN. Le Neu5Ac est lui clairement dominant pour les *N*- et *O*-glycannes dans le cerveau, les testicules, la peau, et les branchies. Les ovaires sont les seuls organes à avoir une dominance franche de NeuGc dans ses glycoprotéines.

A.3.3.2 Analyses par spectrométrie de masse des Ng :

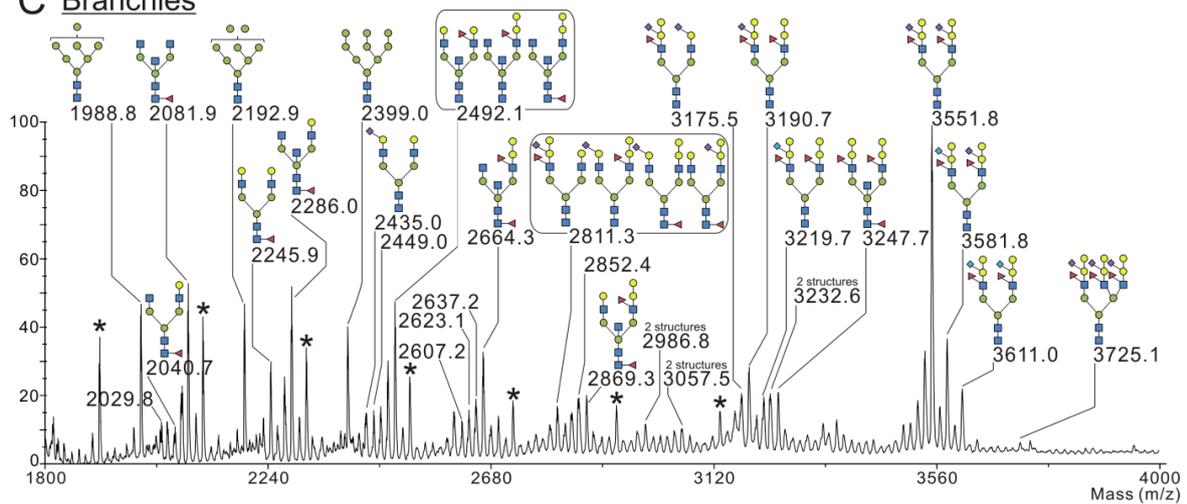
A Cerveau



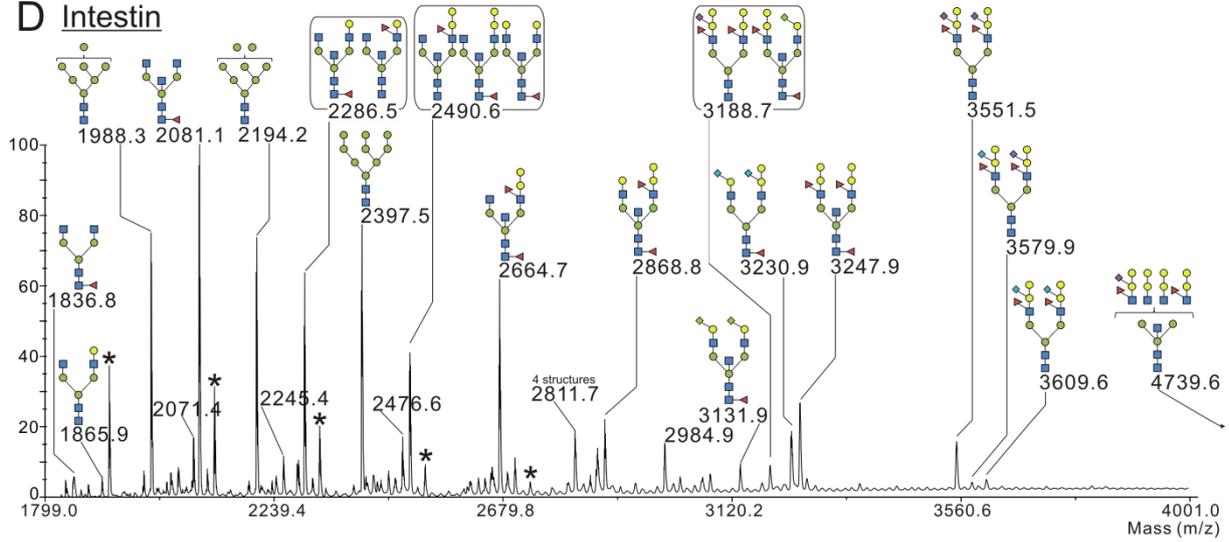
B Coeur



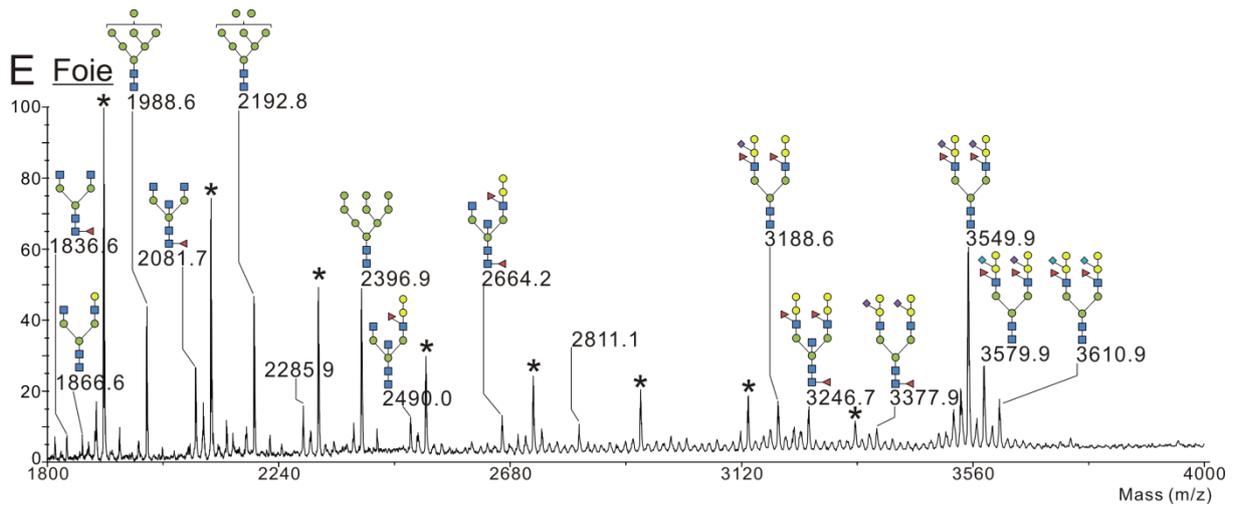
C Branchies



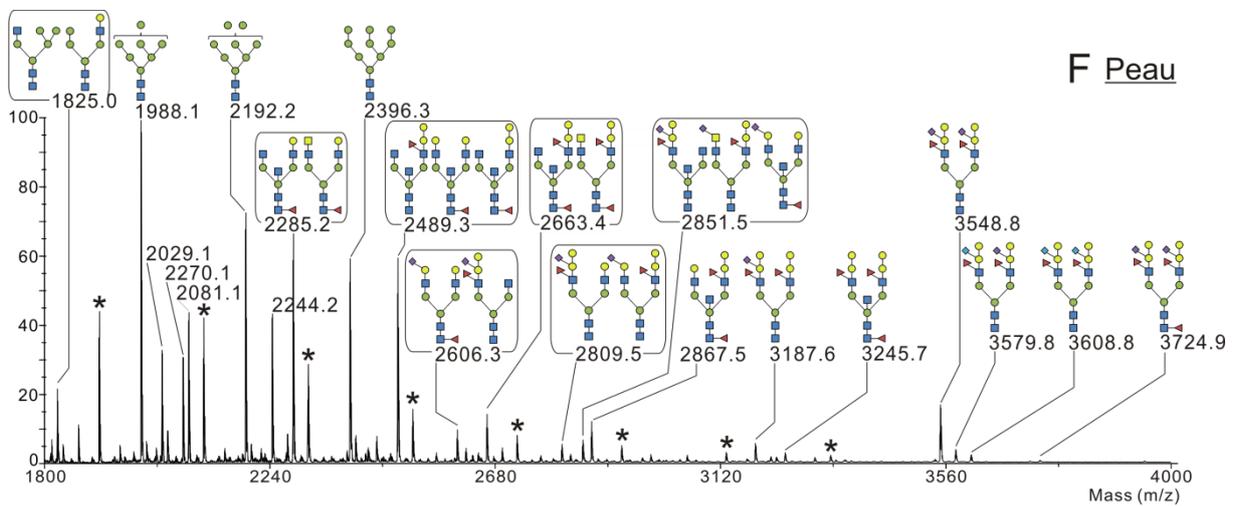
D Intestin



E Foie



F Peau



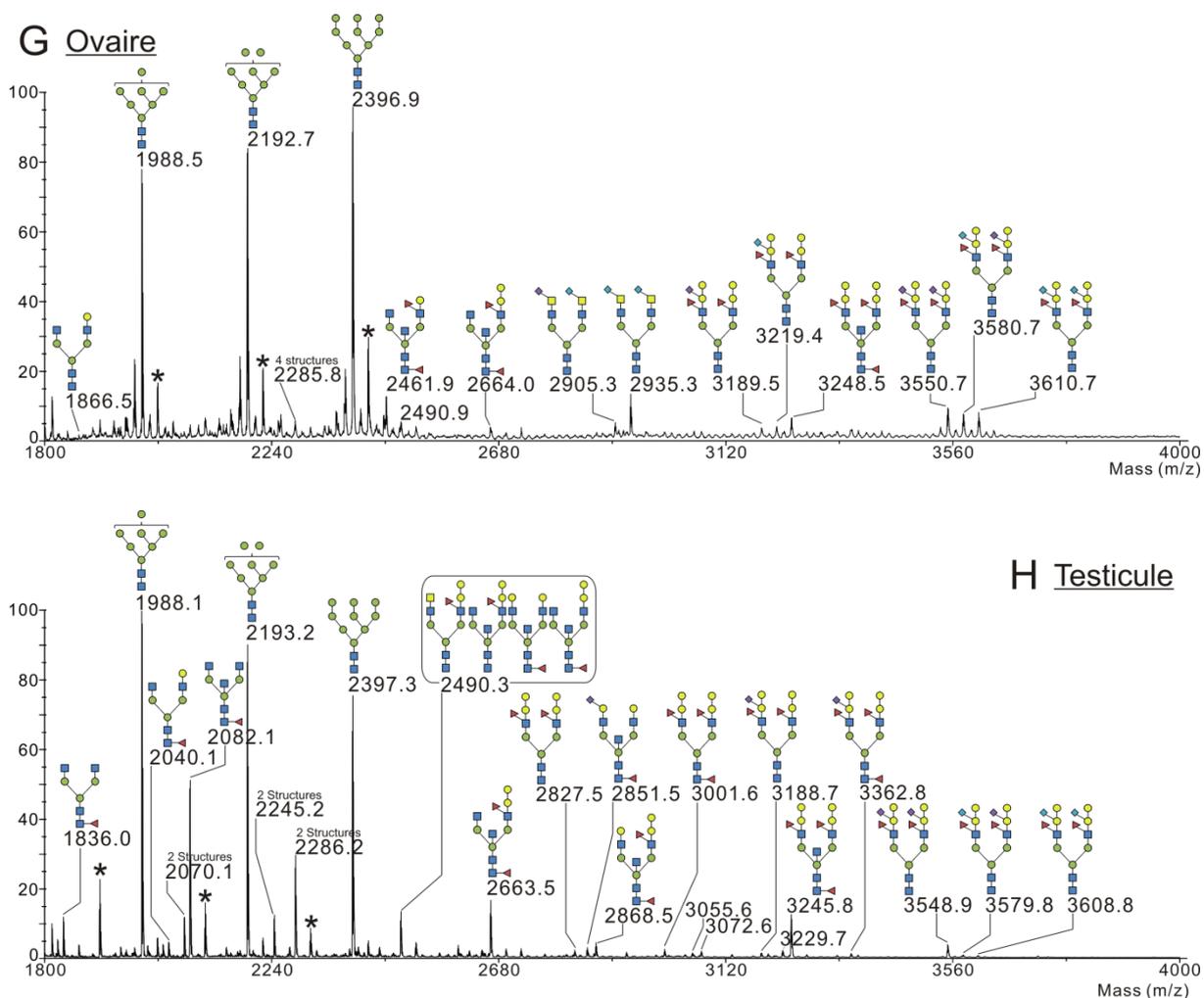


Figure 43 : Profils des *N*-glycannes perméthylés des organes du poisson zèbre adulte :

(A) Cerveau ; (B) Cœur ; (C) Branchies ; (D) Intestin ; (E) Foie ; (F) Peau ; (G) Ovaires ; (H) Testicules.

Le symbole (*) représente des contaminants de type poly-Hex ou des sous-produits de méthylation.

Les *N*-glycannes perméthylés des organes du poisson zèbre ont été analysés par MS et identifiés par MS/MS pour distinguer les structures isobariques. Les résultats attestent de la présence de structures oligo-mannosidiques, de structures complexes principalement bi-antennées et de quelques structures hybrides. La distribution des *N*-glycannes de type oligomannosidique (Man₇₋₉) varie énormément en fonction de l'organe considéré. Ainsi nous pouvons définir clairement 3 groupes d'organes en fonction de la quantité de structures oligomannosidiques qu'ils contiennent : élevée [$\geq 50\%$: ovaires, testicules, intestin et peau], moyenne [Entre 10-50% : foie], faible [$< 10\%$: cerveau, cœur et branchies]. Les *N*-glycannes complexes présentent les modifications suivantes : sialylation, fucosylation (noyau et antenne), extensions Gal- α -Gal, motifs LacdiNAc et GlcNac intercalaires. Le Neu5Ac est majoritaire dans tous les organes sauf dans les ovaires où le Neu5Gc est majoritaire. Le KDN a été identifié dans les Ng par MS/MS dans les intestins par fragmentation de l'ion parent à 3188,7 Da. La présence de plusieurs motifs est également clairement visible sur les spectres MS/MS, tel que le Le^X (Gal- β 1,4-[Fuc- α 2,3]-GalNAc β 1,R), le sLe^X (Neu5Ac- α 2,3-Gal- β 1,4-[Fuc-

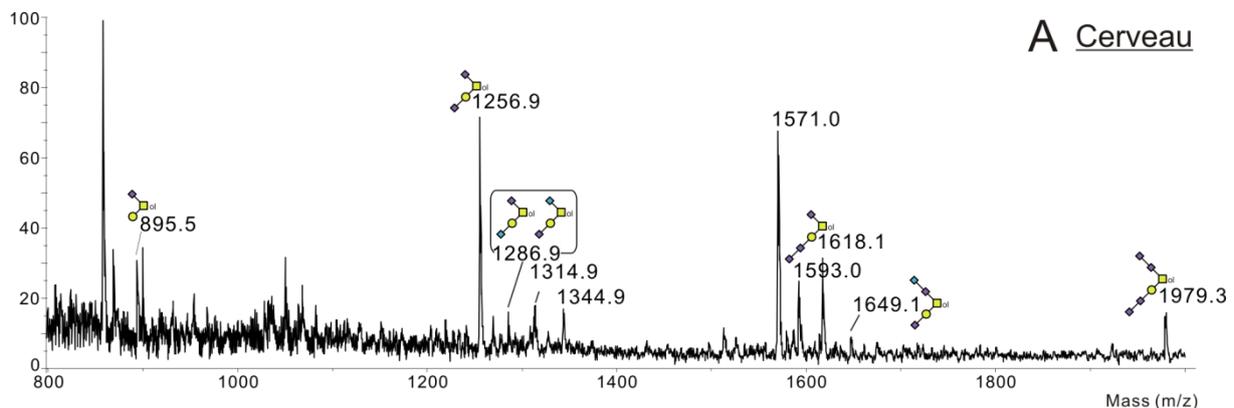
α 2,3-]GalNAc β 1,R) et le « zebrafish epitope » (Gal- β 1,4-[Neu5Ac- α 2,3-]Gal- β 1,4-[Fuc- α 2,3-]GalNAc β 1,R)) qui est en réalité un sLe^X substitué par un Gal en β 1-4 en position terminale. Le « zebrafish epitope » que nous avons précédemment identifié dans les cellules ZFL est présent de manière importante dans tous les organes du poisson ZF et se trouve sous forme simple ou double dans les *N*-glycannes complexes. La répartition des antennes uniquement sialylées ou constituées des antigènes Le^X, sLe^X est extrêmement variable d'un organe à l'autre.

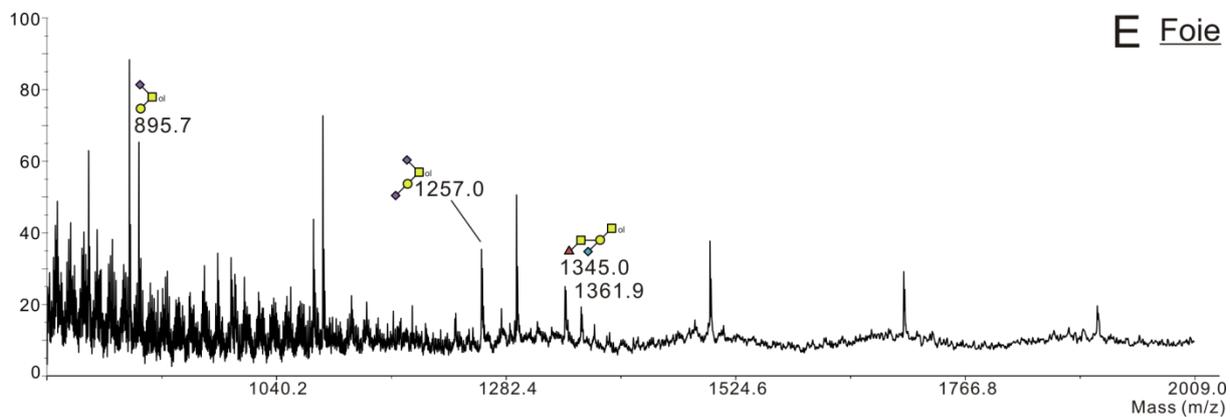
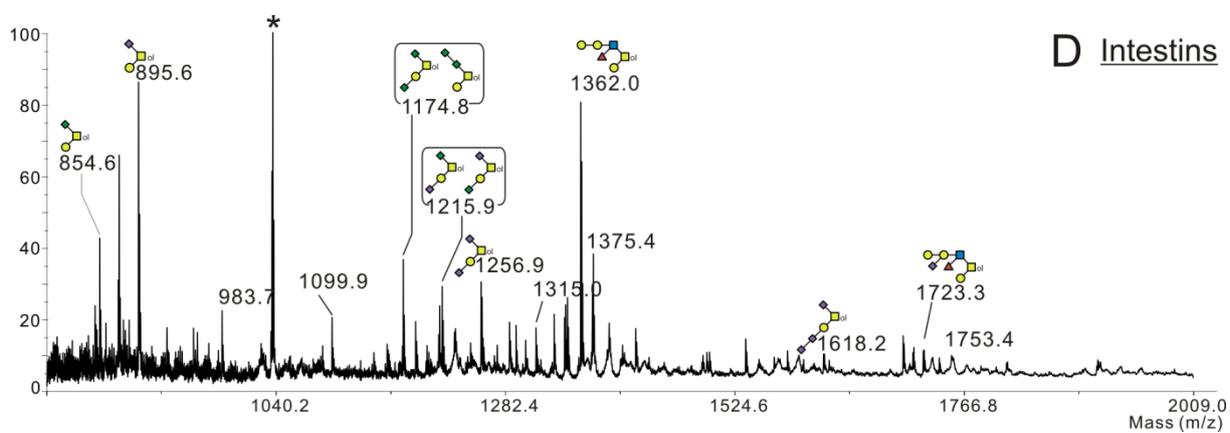
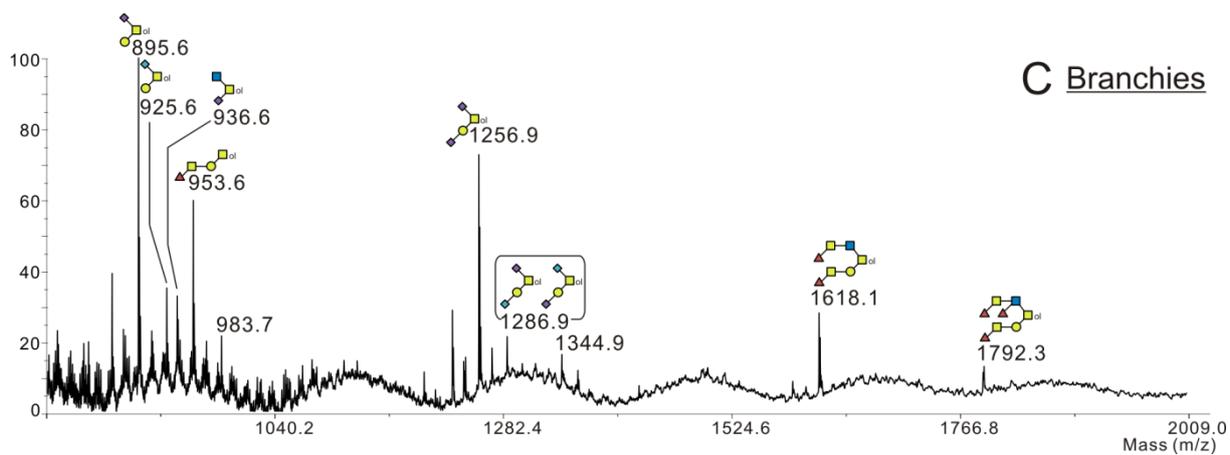
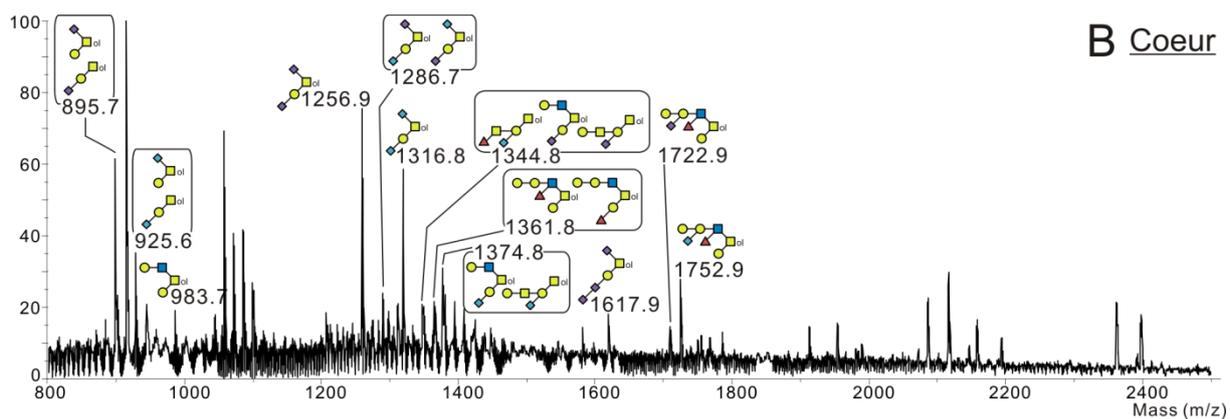
Tableau 8 : Classement général des structures hybrides et complexes identifiées des Ng des organes du ZF.

Le tableau indique la présence en pourcentage de noyaux, d'acides sialiques et de motifs dans les structures de Ng glycannes des organes du poisson zèbre adulte (colonne de Gauche) par rapport à l'ensemble des structures identifiées dans les Ng complexes et hybrides (colonne de droite).

Organe	Noyaux				Modifications				Motifs					NG		
	Hybride	Complexe			GlcNAc Intercal ^R	Ac	Gc	KDN	Fuc	Lex	Noyau Fuc	LacdiNAc	Gal-Gal		Sia-n	Fuc-n
		bi	tri	tetra												
peau	17%	57%	-	-	27%	40%	7%	3%	80%	53%	50%	17%	27%	-	-	30
gills	12%	43%	5%	-	40%	40%	12%	2%	98%	74%	43%	5%	29%	-	-	42
cerveau	-	89%	-	-	11%	67%	17%	-	100%	33%	72%	-	22%	-	-	18
cœur	-	57%	-	-	43%	52%	10%	-	100%	76%	52%	5%	38%	-	-	21
foie	-	56%	-	-	44%	44%	22%	-	100%	78%	44%	-	33%	-	-	9
intestin	3%	46%	-	3%	49%	41%	5%	13%	95%	41%	59%	3%	21%	-	-	38
testis	-	57%	-	-	43%	33%	5%	-	95%	67%	57%	14%	14%	-	-	21
ovaire	8%	75%	-	-	17%	42%	58%	-	67%	67%	17%	33%	8%	-	-	12

A.3.3.3 Analyses par spectrométrie de masse des Og :





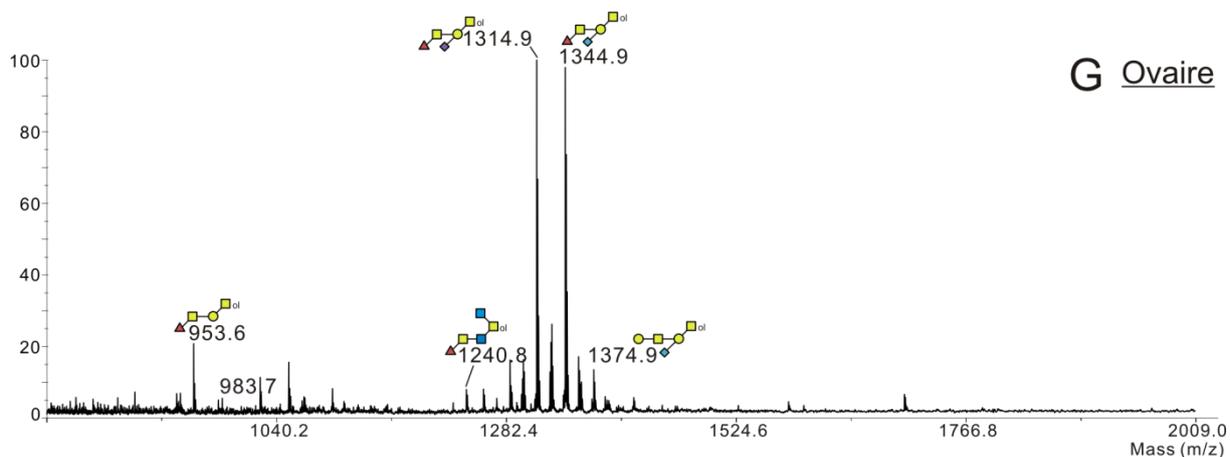
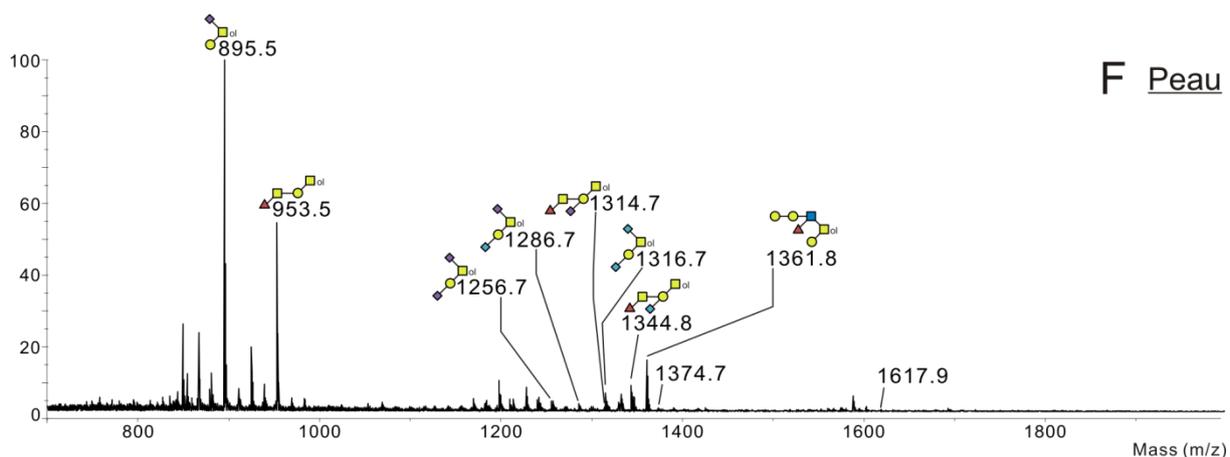


Figure 44 : Profils des *O*-glycannes perméthylés des organes du poisson zèbre adulte :
 (A) Cerveau ; (B) Cœur ; (C) Branchies ; (D) Intestin ; (E) Foie ; (F) Peau ; (G) Ovaires ; (H) Testicules.

Les *O*-glycannes des organes du ZF adulte présentent une distribution particulière de structures fucosylées et sialylées portées exclusivement par des noyaux de type 1 et 2. Les *O*-glycannes sialylés présentent des structures simples comprenant de une à quatre unités de d'acide sialique portées directement par un noyau de type 1, ce qui donne les masses suivantes pour du Neu5Ac : 895 m/z (1 Neu5Ac), 1256 m/z (2 Neu5Ac), 1617 m/z (3 Neu5Ac) et 1979 m/z (4 Neu5Ac). Ces structures sialylées peuvent également accueillir des acides sialiques de type Neu5Gc (cerveau, cœur et peau) ou KDN (intestins). Des structures plus complexes de noyaux de type 2 fucosylées sur la GlcNAc ont également été rapportées et peuvent être étendues par des motifs Gal-Gal sialylés ou non.

Tableau 9 : Classement général des structures identifiées des O-glycannes des organes du ZF.

Le tableau indique la présence en pourcentage de noyaux, d'acides sialiques et de motifs dans les structures de Og glycannes des organes du poisson zèbre adulte (colonne de Gauche) par rapport à l'ensemble des structures identifiées dans les Og (colonne de droite).

Organe	Noyaux				Modifications				Motifs					OG
	1	2	3	4	Ac	Gc	KDN	Fuc	Lex	LacdiNAc	Gal-Gal	Sia-n	Fuc-n	
skin	89%	11%	-	-	44%	33%	-	44%	11%	-	11%	-	-	9
gills	82%	9%	9%	-	45%	27%	-	27%	-	18%	-	-	-	11
brain	100%	-	-	-	100%	43%	-	0%	-	-	-	43%	-	7
heart	76%	24%	-	-	53%	47%	-	29%	18%	-	24%	6%	-	17
liver	100%	-	-	-	75%	25%	-	25%	-	-	-	-	-	4
intestine	90%	10%	-	-	50%	-	40%	20%	20%	-	20%	10%	-	10
testis	89%	11%	-	-	67%	11%	-	44%	22%	-	22%	11%	-	9
ovary	83%	-	-	17%	17%	33%	-	67%	-	-	-	-	-	6

A.3.4 Immuno-marquage du KDN :

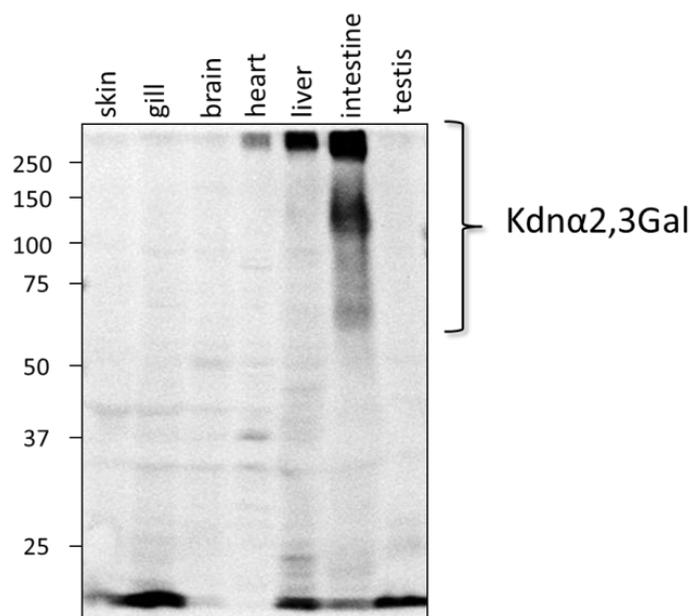


Figure 45 : Western-Blot des glycoprotéines des organes du ZF adulte avec un anticorps anti-KDN.

Western-Blot à 10 % d'acrylamide avec les glycoprotéines des organes du ZF avec un anticorps primaire anti-KDN α 2-3Gal et un anticorps secondaire fluorescent (FITC).

Pour confirmer les observations effectuées sur le KDN des glycoprotéines, l'équipe du Pr Ken Kitajima a réalisé un *Western Blot* sur les glycoprotéines du ZF qui a révélé la présence de KDN dans celles-ci grâce à un anticorps anti-KDN α 2-3Gal (cf. Figure 45). Ainsi, nous visualisons directement la forte présence de KDN dans les glycoprotéines intestinales et un marquage moins intense dans le foie et le coeur. Les autres organes ne semblent pas présenter l'épitope KDN α 2-3Gal dans la structure de leurs glycoprotéines. Basées sur ces

premiers résultats, des expériences d'immunomarquages ont été réalisées sur des coupes de paraffine de foie et d'intestins de ZF adulte pour préciser la localisation des sialo-conjugés à KDN.

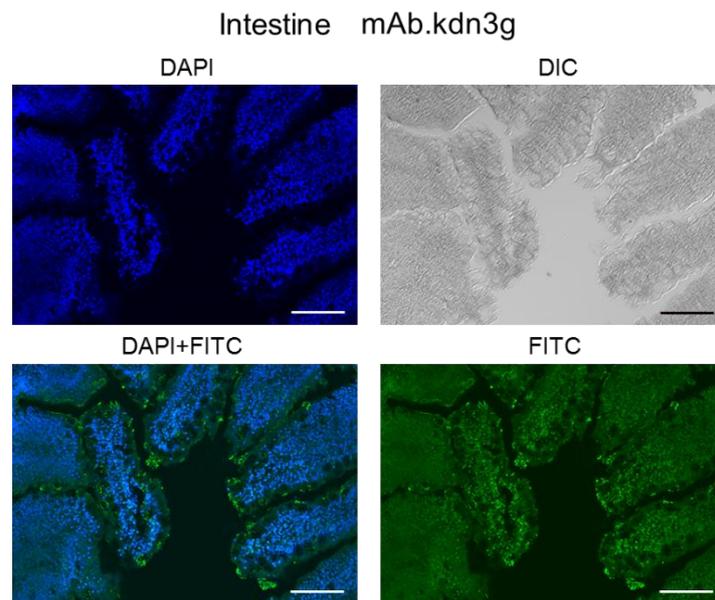


Figure 46 : Immunomarquage des structures KDN liées en α 2-3 dans les intestins du ZF adulte.
Les structures à KDN ont été visualisées à l'aide d'un anticorps anti-KDN α 2-3Gal et d'un anticorps secondaire couplé à la FITC sur une coupe de paraffine d'intestin de ZF adulte. Les résultats ont été comparés au témoin utilisant un contrôle IgM et l'anticorps secondaire ; celui-ci ne montre qu'un très léger bruit de fond non spécifique. Les noyaux ont été marqués au DAPI et une image en contraste de phase a été réalisée en DIC (*Differential Interference Contrast*).

Les résultats de ce marquage montrent la présence d'une quantité importante de KDN à la périphérie des cellules intestinales (*cf.* Figure 46) qui pourrait correspondre à des agrégats de mucines contenant du KDN lié en α 2-3. Des tests similaires ont été réalisés avec un anticorps anti-KDN α 2-8KDN ciblant des structures oligomérisées du KDN et ont montré une absence totale de marquage dans l'intestin du ZF adulte. Ces résultats démontrent que les glycoconjugués substitués par du KDN sont très majoritairement exprimés au sein de la couche muqueuse qui recouvre les cellules épithéliales de la lumière intestinale. Ce KDN pourrait provenir d'un recyclage du KDN produit par le microbiote intestinal.

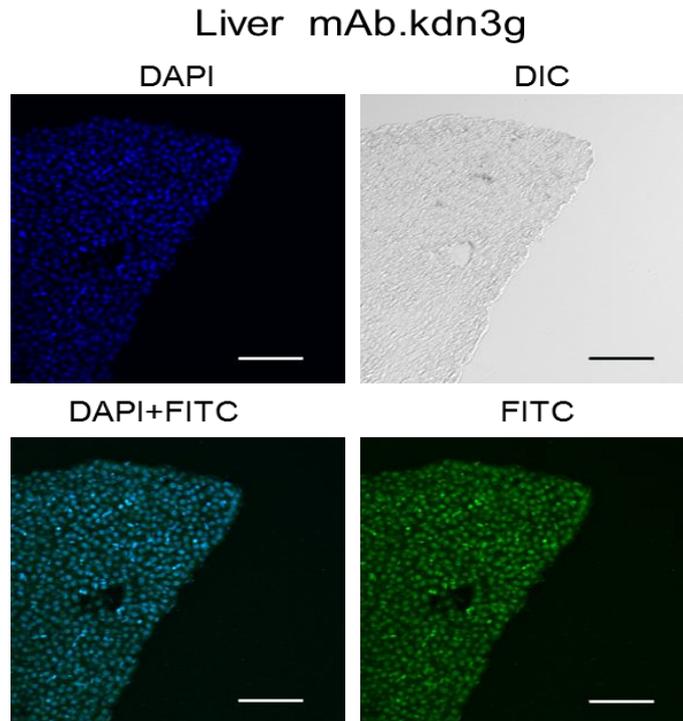


Figure 47 : Immunomarquage des structures KDN liées en α 2-3 dans le foie du ZF adulte
 Les structures à KDN ont été visualisées à l'aide d'un anticorps anti-KDN α 2-3Gal et d'un anticorps secondaire couplé à la FITC sur une coupe de paraffine de foie de ZF adulte. Les résultats ont été comparés au témoin utilisant un contrôle IgM et l'anticorps secondaire ; celui-ci ne montre qu'un très léger bruit de fond non spécifique. Les noyaux ont été marqués au DAPI et une image en contraste de phase a été réalisée en DIC (*Differential Interference Contrast*).

La localisation du KDN α 2-3Gal lié au foie (*cf.* Figure 47) est surprenante puisque la totalité des cellules de la coupe est fluorescente, ce qui indique que le KDN est présent dans l'ensemble des cellules du foie. Cette distribution homogène n'est pas en faveur d'une origine exogène du KDN comme dans le cas de l'intestin. La seule manière d'expliquer la répartition du KDN dans le foie du ZF serait qu'il puisse en bio-synthétiser lui-même.

A.3.5 Expression des Glyco-Gènes :

Nous avons commencé à caractériser les niveaux d'expression des enzymes impliquées dans la glycosylation terminale et plus précisément des sialyltransférases et des fucosyltransférases grâce aux collaborations respectives du Dr Anne Harduin-Lepers et du Dr Emeline Fabre. Ces travaux ont pour objectifs de relier les expressions des glyco-gènes de chaque organe avec les structures glycaniques identifiées. Nous avons aussi cherché à identifier les enzymes responsables de la présence du Neu5Gc dans le cerveau et les FT responsables de la biosynthèse des structures oligofucosylées dans les GSL des ovaires du ZF adulte. Nous avons pour ce faire étudié les niveaux d'expression des ARNm de chaque

organe par des expériences de RT-PCR en ciblant des glyco-gènes. La conception des amorces des ARNm cibles dans le ZF provient soit de l'identification par homologie de séquences des gènes des glyco-enzymes Humaines ou des gènes directement identifiés dans le ZF (cf. [A.2.2 Publication](#) :).

A.3.5.1 Régulation de l'acide sialique :

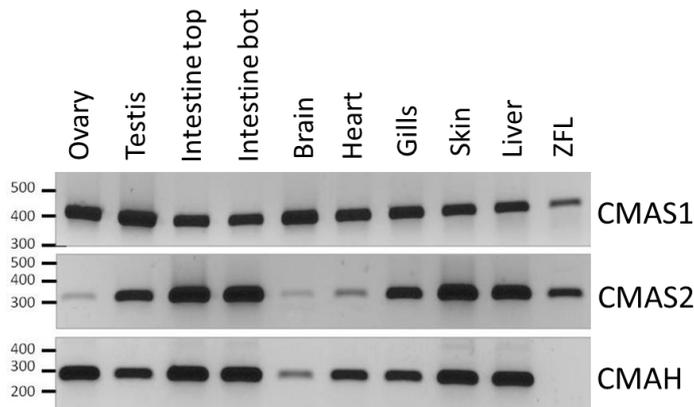


Figure 48 : RT-PCR sur les ARNm des organes du ZF ciblant les enzymes des voies métaboliques des Sia.

Les RT-PCR des ARNm du poisson zèbre ont été dirigés contre les enzymes impliquées dans le métabolisme de l'acide sialique à savoir la CMAS 1, la CMAS 2 (*CMP-Sialic Acid Synthase*) et la CMAH (*Cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase*).

Premièrement, les résultats des RT-PCR montrent les niveaux d'expression du gène de la CMAH (*Cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase*), CMAS1 (*CMP-Sialic Acid Synthase 1*) et CMAS2 (*CMP-Sialic Acid Synthase 2*) dans l'ensemble des organes du ZF adulte. Le niveau de transcription du gène CMAH dans le cerveau du ZF est relativement faible par rapport aux autres organes mais pourrait expliquer la transformation du Neu5Ac en Neu5Gc et donc la présence de Neu5Gc dans les glycoconjugués du cerveau. Les CMAS 1 et 2 activent l'acide sialique en CMP-Sia et ont des affinités différentes pour chaque type d'acide sialique. La CMAS 1 a plus d'affinité pour le Neu5Ac et Neu5Gc alors que la CMAS 2 a plus d'affinité pour le KDN ([Schaper, Bentrop et al. 2012](#)). Nous observons une répartition homogène des ARNm de la CMAS 1 dans l'ensemble des organes du ZF adulte alors que la CMAS 2 est majoritairement exprimée au niveau des testicules, des intestins, des branchies, de la peau et du foie. L'absence d'expression du gène de la CMAS2 dans le cerveau et l'ovaire correspond bien aux analyses des GP par HPLC et WB, qui ne révèlent pas la présence de KDN dans ces organes. Cette répartition des CMAS 1 et 2 dans les organes du ZF indiquent qu'ils seraient tous capables de métaboliser le Neu5Ac et le Neu5Gc, alors que seuls les organes qui expriment la CMAS 2 seraient capables d'activer le KDN et potentiellement de le transférer sur leurs glycoconjugués.

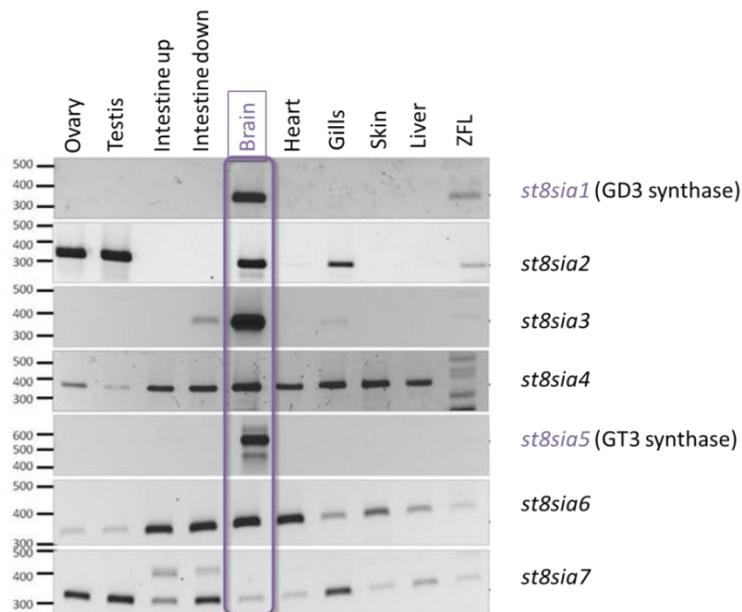


Figure 49 : RT-PCR sur les ARNm des organes du ZF ciblant les Sialyl-Transférases.

Les RT-PCR des ARNm du poisson zèbre a été dirigés contre les Sialyl-Transférases, ST8-Sia1, ST8-Sia2, ST8-Sia3, ST8-Sia4, ST8-Sia5, ST8-Sia6 et ST8-Sia7 qui sont toutes des α 2-8 ST.

Les ST8Sia sont des sialyltransférases capables de transférer de l'acide sialique par la formation de liaisons en α 2-8 sur un autre résidu d'acide sialique. Les ST8Sia ont des affinités pour leurs substrats accepteurs plus ou moins spécifiques. La liste des substrats accepteurs des ST8Sia que nous avons testées est disponible dans les informations supplémentaires de l'article sur les cellules ZFL. Les résultats des RT-PCR sur les ARNm des ST8Sia des organes du ZF adulte indiquent la capacité de chaque organe à polymériser l'acide sialique sur ses glycoconjugués. Le cerveau exprime fortement l'ensemble des ST8Sia que nous avons testées à l'exception de la ST8Sia-7 qui est faiblement exprimée. La ST8Sia-1 synthétise le GD3 dans le cerveau et la ST8Sia-5 catalyse la formation de GD1c, GT1a, GQ1b et GT3 dans le cerveau afin de former de nouvelles liaisons Sia α 2-8Sia et d'augmenter le niveau de sialylation de ces GSL. La ST8Sia-3 n'a pas de substrat accepteur très spécifique et pourrait agir sur des GP ou des GSL au niveau des motifs suivants : Neu5Ac α 2-3Gal β 1-R ou Neu5Ac α 2-6GalNAc-R. Les ST8Sia-1, ST8Sia-3 et ST8Sia-5 sont exclusivement exprimées au niveau du cerveau du ZF adulte et sont en mesure d'expliquer le profil d'expression des GSL que nous y avons découvertes. *A contrario*, ces trois ST8Sia ne sont pas exprimées au niveau des autres organes du ZF adulte ce qui explique pourquoi ils ne bio-synthétisent pas de structures oligosialylées dans leurs GSL. Les ST8Sia2 et ST8Sia4 sont des polysialyltransférases qui ciblent principalement les *N*-glycannes (NCAM) au niveau du motif Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4GlcNAc-R, alors que la ST8Sia6 cible principalement les *O*-glycannes au niveau du motif Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GalNAc-R. Le gène de la ST8Sia2 est exprimé uniquement dans les organes suivants : ovaires, testicules, branchies et cerveau. L'ARNm de la ST8Sia4 a un niveau d'expression homogène dans l'ensemble des organes à l'exception des ovaires et des testicules, qui ont un niveau d'expression relativement faible. Nous n'avons

cependant pas observé de phénomène d'oligo-sialylation des Ng du ZF adulte lors des analyses. La ST8Sia6 est majoritairement exprimée au niveau du cerveau, du cœur et des intestins du ZF adulte qui synthétisent beaucoup de structures des Og oligosialylés. Enfin, la ST8Sia-7 n'est pas présente chez l'Homme et n'a pas encore été caractérisée chez le ZF. Néanmoins, les ST8Sia-6 et ST8Sia-7 auraient probablement un gène ancestral en commun et devraient donc avoir des activités enzymatiques proches. Il est donc impossible pour l'instant de rattacher l'activité de la ST8Sia-7 à la biosynthèse d'une structure oligosialylée bien précise (Harduin-Lepers, Petit et al. 2008). Cependant, son expression est spécifique de certains organes (ovaires, testicules, branchies, intestin inférieur et intestin supérieur) et varie significativement dans l'intestin avec une expression est forte dans la partie inférieure et faible dans la partie supérieure.

A.3.5.2 Les Fucosyltransférases :

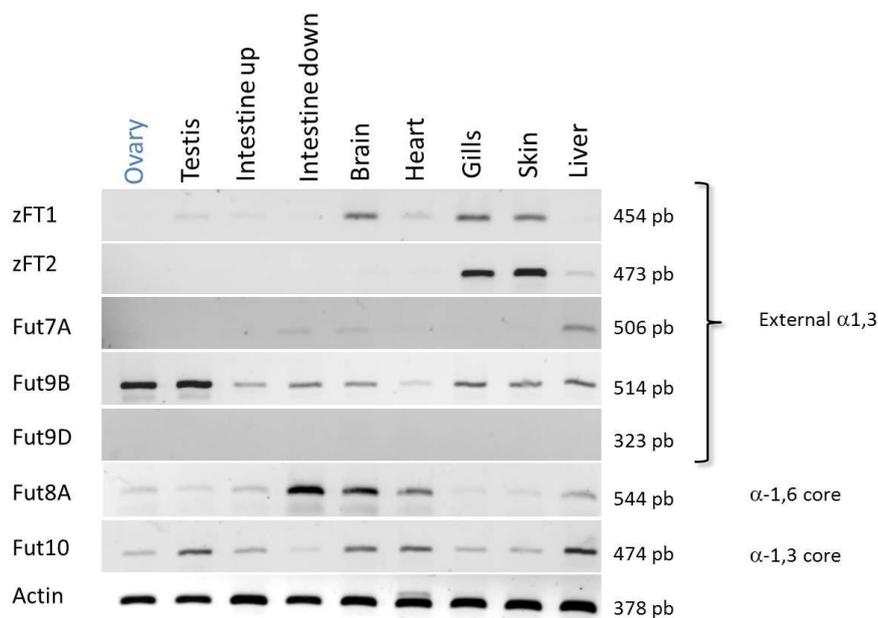


Figure 50 : RT-PCR sur les ARNm des organes du ZF ciblant les Fucosyl-Transférases (FT).

Les RT-PCR des ARNm du poisson zèbre ont été dirigés contre les Fucosyltransférases, zFT1, zFT2, Fut7A, Fut9B, Fut9D, Fut8A et Fut10 qui sont toutes des α1-3 ou α1-6 FT ciblant le noyau ou les antennes des N-glycannes.

L'expression des FT dans les organes du ZF nous aide à comprendre la glycosylation des Ng et plus particulièrement les phénomènes de fucosylation du noyau et des antennes. Les zFT1, zFT2, Fut7A, Fut7B et Fut9D forment toutes des liaisons en α1-3 au niveau des antennes des Ng et seule les Fut9A et Fut9B peuvent agir au niveau des GSL. L'expression des Fut7A et Fut9B est quasiment nulle chez le ZF adulte. L'expression de Fut9B est : faible dans le cœur ; moyenne dans la peau, le foie, les intestins, les branchies et le cerveau ; forte dans les testicules et le cerveau. Seules les branchies, la peau et le cerveau sont capables d'exprimer zFT1 et zFT2. Les enzymes Fut-8A et Fut-10 agissent sur le noyau des Ng et forment respectivement des liaisons Fuca1-6GlcNAc et Fuca1-3GlcNAc. Ces deux enzymes

ont des profils d'expression différents dans les organes du ZF et montrent que les deux types de liaison (α 1-3 et α 1-6) du fucose sur le noyau des Ng sont possibles.

Ces premiers résultats nous servent à définir le niveau d'expression de nombreuses FT dans les organes du ZF adulte. Nous avons également voulu identifier les fucosyltransférases spécifiques de l'ovaire et qui permettraient d'expliquer la présence de structures oligo-fucosylées présentes uniquement dans les GSL ovariens. Pour ce faire nous avons étendu l'analyse aux FT suivantes : Fut7B, Fut8B, Fut9A, Fut9C, Fut9F, Fut9G, Fut9L, Fut9K et Fut9P qui sont toutes des α 1-3 ou α 1-6 fucosyltransférases. Cependant, nous n'avons pour l'heure pas découvert d'expression suffisamment forte et spécifique qui puisse impliquer formellement une fucosyltransférase particulière dans la biosynthèse des structures oligofucosylées, bien que nous ayons découvert une expression spécifique mais faible des fucosyltransférases Fut9A et Fut 9K.

A.3.6 Base de données glycaniques du poisson zèbre :

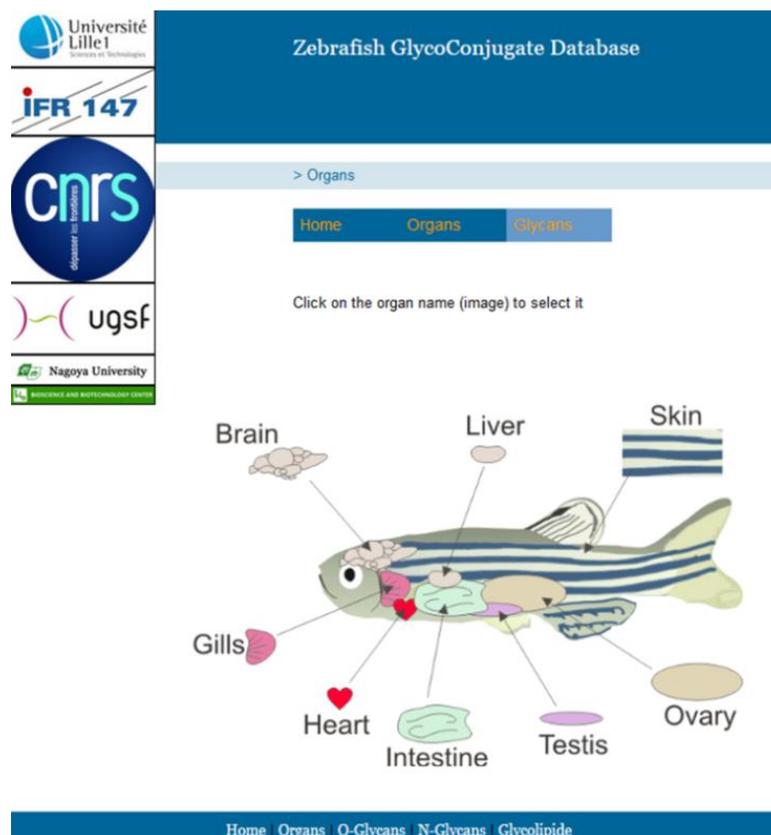


Figure 51 : Page d'accueil de la Base de données des glycanes des glycoconjugués du ZF. La page de présentation de la base de données servira à diriger les utilisateurs vers l'analyse structurale d'un organe entier ou d'un type de glycanes ou de motifs particuliers.

Suite à l'ensemble de ces travaux, nous avons décidé de développer une nouvelle base de données de structures des glycanes, qui sera composée de l'ensemble des spectres

MS et MS/MS des glycosphingolipides, des *N*-glycannes et des *O*-glycannes. Cette base de données servira à organiser et à diffuser le plus largement possible les informations découvertes sur l'organisation structurale des glycannes des glycoconjugués du poisson zèbre, afin de faire de celui-ci un modèle d'excellence pour l'étude de la glycobiologie structurale et fonctionnelle. Dans ce but, nous avons développé une base de données dynamique, qui puisse être facilement consultable et actualisable, afin d'offrir le meilleur niveau d'information possible et de faciliter les recherches des utilisateurs en incluant des recherches spécifiques (cf. Figure 52) en fonction de différents critères : nature, groupe caractéristique, motif glycannique, type de sialylation et de fucosylation, etc. ... Cette base de données représente la première cartographie glycannique complète d'un organisme modèle, incluant les glycannes majeurs des glycoprotéines et les glycosphingolipides, qui est analysée par une seule équipe, grâce à une technique d'analyse homogène qui permet la comparaison directe de différentes structures glycanniques au sein des organes du ZF adulte. En fait, la comparaison de structures glycanniques décrites dans différentes banques de données glycanniques (CFG) s'appuie sur la collecte de spectres MS issus d'équipes différentes et de techniques différentes, qui rendent la comparaison directe entre les organes plus incertaine.



Figure 52 : Illustration du fonctionnement de la database sur un exemple de recherche de Ng.

A terme, notre base de données glycaniques pourrait s'inclure dans le projet du Glycome Atlas ([Konishi and Aoki-Kinoshita 2012](#)) qui référence depuis 2012 les structures glycaniques organe par organe chez la souris et l'homme. Le fonctionnement et l'organisation de cette base de données structurales des glycanes est consultable à l'adresse suivante : <http://www.rings.t.soka.ac.jp/GlycomeAtlas/GUI.html>. L'Atlas Glycome inclus des données présentes sur le site du CFG et permet aux scientifiques d'apporter leurs contributions aux connaissances structurales de ces modèles. Ainsi, nous pourrions inclure notre démarche scientifique dans un processus de données plus global, afin de diffuser et de créer une plateforme structurale dédiée à la glycosylation des modèles de vertébrés.

Chapitre 4 : Conclusions

Cette étude structurale de la glycobioologie du poisson zèbre adulte nous a permis de définir un ensemble de 384 structures de GSL et de *N*- et *O*-glycannes présents dans les 8 organes suivants : cerveau, cœur, branchies, intestins, foie, peau, ovaires et testicules. Ces analyses permettent d'appréhender les différences dans la distribution des structures glycaniques au sein des organes du ZF adulte. La présence de structures nouvelles et originales a également été mise en évidence au sein des GSL et des glycoprotéines. Les GSL de la série LcGg sont abondamment présents dans les ovaires et les embryons sous la forme de structures oligo-fucosylées particulières. Les GSL de la série Gg possèdent des extensions intéressantes dans plusieurs organes et présentent des formes sialylées et fucosylées. Les Ng de tous les organes ont des antennes constituées d'un motif particulier de sLe^x (ou Le^x) substitué par un galactose terminal que nous avons appelé « zebrafish epitope ». Les Og présentent des structures oligosialylées classiques sur un noyau de type 1 et des structures plus complexes sur un noyau 2 qui peuvent être fucosylées et sialylées.

Ces travaux mettent également en lumière les fortes disparités de l'acide sialique de type Neu5Ac, Neu5Gc et KDN dans l'organisme du ZF adulte. La présence de KDN dans les glycoconjugués des intestins et du foie est surprenante et devrait s'expliquer par la capacité du poisson zèbre à le synthétiser dans ces organes. La présence de Neu5Gc en faible quantité dans le cerveau et en forte quantité dans les ovaires et les embryons est également surprenante. Ces observations ont pu être appuyées par des analyses préliminaires de biologie moléculaire qui ciblent l'expression des ARNm de plusieurs glyco-enzymes clés et des analyses d'immuno-marquage du KDN α 2-3Gal.

Les analyses de biologie moléculaire apportent également des informations sur les niveaux d'expression des glycosyltransférases (ST et FT) dans chaque organe et permettent de relier les résultats structuraux obtenus avec l'expression des différentes GT. Enfin, La création d'une base de données spécifique au poisson zèbre, que nous développons actuellement sera un outil supplémentaire pour diffuser nos connaissances structurales et faire du poisson zèbre un excellent modèle d'étude de la glycobioologie, capable de sonder plus facilement les relations entre la structure et la fonction des glycoconjugués.

L'ensemble de ces travaux nous donne une vision détaillée de l'organisation structurale des glycannes des glycoconjugués du poisson zèbre et a permis l'identification de plus de 300 structures par des analyses structurales de MS/MS. De plus, ces travaux nous ont permis d'ouvrir d'intéressantes pistes de recherche sur les structures atypiques découvertes lors de ces analyses, qu'il nous faudra isoler et caractériser plus finement pour déterminer avec certitude les liaisons et la nature des monosaccharides qui les composent. En outre, les fonctions et les enzymes de biosynthèses associées à ces nouvelles structures ne sont pas toutes connues et devront être identifiées. Enfin, de nouvelles analyses

structurales chez d'autres modèles aquatiques devront être réalisées pour comparer les structures présentes chez le poisson zèbre avec celles d'autres poissons comme le Medaka ou *Oryzias latipes*, qui est également un modèle de vertébré très utilisé, en particulier au Japon, afin de savoir si l'organisation structurale des glycanes que nous avons décrite est spécifique du poisson zèbre ou commune aux Actynoptériens.

PARTIE B

PARTIE B : Génération d'une banque de Sucres-Alcynes pour visualiser le métabolisme des glycannes

Chapitre 1 : la « Click Chemistry »

B.1.1 Introduction :

La « *click-chemistry* » est un terme inventé par le Pr Sharpless ([Kolb, Finn et al. 2001](#)) du *Scripps Research Institute and Integrated Diagnostics™* de l'université de Berkeley en Californie en 2001 pour décrire un ensemble de réactions qui partagent les conditions suivantes : formation d'une liaison covalente entre deux réactifs spécifiques; une stéréospécificité ; conditions réactionnelles douces; une thermodynamique favorable; une réaction efficace à petite et grande échelle; la disponibilité des réactifs de départ; la formation d'un seul produit; un haut rendement réactionnel sans purification ou avec une purification simple (cristallisation/distillation); et c'est une chimie verte à haute économie d'atome. Cette méthode de liaison bio-orthogonale permet un assemblage facilité de « blocs » moléculaires en une seule réaction grâce à deux fonctions chimiques abiotiques spécifiques portées par deux réactifs distincts de type : azide-alcyne, cétone-hydrazine ou arylazide-phosphine. La 1^{ère} réaction de click-chemistry est la réaction de liaison de Staudinger (SL) de 1919 qui met en jeu un azide terminal et une phosphine tertiaire afin de former une liaison covalente de type iminophosphorane en condition douce (RT) ([Staudinger 1919](#)). Cependant, la réaction la plus populaire de click-chemistry est celle de Huisgen de 1967 ([Huisgen 1967](#)) réalisée par *Azide-Alkyne cyclo-addition* (AAC) à 98°C en milieu aqueux, même si cette réaction ne correspond pas strictement à la définition de click-chemistry puisqu'elle forme deux stéréo-isomères. Les avantages et les applications de la réaction de Huisgen ont été révélés longtemps après sa découverte en 2002 par les groupes de Meldal ([Tornøe, Christensen et al. 2002](#)), et de Folin et Sharpless ([Rostovtsev, Green et al. 2002](#)), qui l'ont optimisée grâce à une catalyse de cuivre (CuAAC). Cette catalyse réduit significativement la température d'activation de la réaction par la formation d'un métallo-cycle intermédiaire et rend compatible cette réaction de couplage avec les contraintes de température, de pH et de solvant des milieux biologiques. De plus, les fonctions azides-alcynes sont naturellement absentes des milieux biologiques et quasiment inertes vis-à-vis des molécules présentes dans les cellules vivantes, ce qui ne perturbe pas l'état physiologique des cellules. Cependant le Cu(I) utilisé comme catalyseur est nocif pour les cellules car il produit des espèces réactives oxygénées (ROS) qui conduisent à la mort cellulaire. Ce phénomène cytotoxique est largement réduit par l'utilisation de ligands spécifiques ([Besanceney-Webler, Jiang et al. 2011](#)) qui piègent le Cu(I) et le laisse disponible pour la réaction, ce qui permet de diminuer sa nocivité et d'améliorer la cinétique

réactionnelle. Une nouvelle forme de click-chemistry est réalisée en condition biologique sans la catalyse du cuivre, elle est appelée *Cu-free Azide-Alcyne cycloaddition (Cu-free AAC)* ou *Strain Promoted Azide-Alcyne cycloaddition (SPAAC)* ([Agard, Prescher et al. 2004](#)). Cette alternative a été développée par l'équipe du Pr Bertozzi grâce à des alcynes cycliques optimisés pour favoriser thermodynamiquement la réaction afin de la rendre spontanée. Nous allons définir dans cette introduction les mécanismes réactionnels de CuAAC, les molécules impliquées dans la SPAAC, ainsi que les applications biologiques et thérapeutiques de la click-chemistry en glycobiochimie.

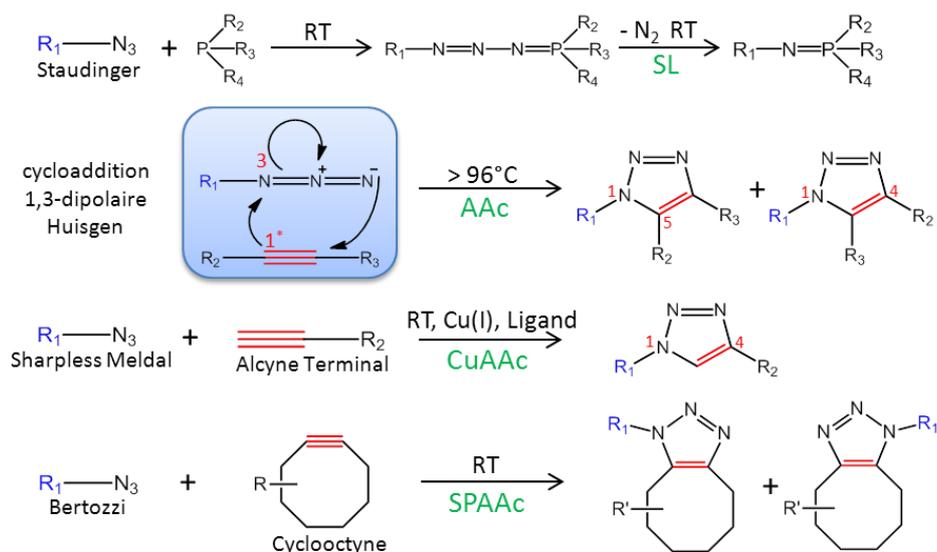


Figure 53 : Présentation des principales réactions dites de "Click-Chemistry"

Présentation des quatre réactions majeures de click-chemistry : *Staudinger ligation (SL)* ([Staudinger 1919](#)), *1,3-dipolar Azide-Alcyne cycloaddition (AAC)* de Huisgen ([Huisgen 1967](#)), *Copper catalyzed 1,3-dipolar Azide-Alcyne cycloaddition (CuAAC)* de Meldal ([Tornøe, Christensen et al. 2002](#)) et Sharpless ([Rostovtsev, Green et al. 2002](#)) et la *Strain promoted 1,3-dipolar Azide-Alcyne cycloaddition (SPAAC)* de Bertozzi ([Agard, Prescher et al. 2004](#)).

B.1.2 Mécanisme réactionnel de la CuAAC :

La CuAAC est une réaction qui nécessite la présence de Cu(I) disponible directement sous forme de CuBr (Bromure de Cuivre) ou obtenu grâce à la réduction du sulfate de cuivre penta-hydraté par de l'acide ascorbique. Son mécanisme réactionnel probable ([Rostovtsev, Green et al. 2002](#)) (cf. Figure 54) met en évidence le rôle du ligand dans la captation du cuivre, sa disponibilité et son maintien dans l'état d'oxydo-réduction de type Cu(I). Plusieurs molécules de cuivre et de ligands peuvent s'associer pour former un complexe appelé $[CuL_n]^+$ où n représente le nombre de ligands impliqués. Puis, le complexe $[CuL_n]^+$ va déprotoner l'acétylène par son caractère basique et ensuite se complexer avec celui-ci. L'azote terminal du groupe azoture va réagir par une attaque nucléophile sur le complexe CuL_{n-1} associé à l'acétylène et entraîner la formation d'un métallo-cycle intermédiaire à 6 atomes par un phénomène de cyclo-addition 1,3-dipolaire. Le métallo-cycle est constitué de Cu(III)

associé au complexe $\text{Cu}_{L_{n-2}}$ et d'un carbone radicalaire d'hybridation sp particulièrement instable qui va par un réarrangement électronique de ses orbitales π et σ former un cycle 1,4,5-triazole. Cette molécule libère ensuite le complexe $\text{Cu}_{L_{n-2}}$ par une re-protonation qui conduit à la formation finale du cycle 1,4-triazole et à la régénération du catalyseur sous forme $[\text{Cu}_{L_n}]^+$ par réassociation avec des molécules de ligands disponibles dans le milieu réactionnel. Pour que cette régénération du complexe $[\text{Cu}_{L_n}]^+$ soit optimale au niveau de la cinétique et de la cytotoxicité cellulaire du $\text{Cu}(\text{I})$, il faut que le ratio entre le cuivre et le ligand soit de 1 pour 6. Récemment, Un mécanisme réactionnel similaire précise que deux atomes de cuivre $[\text{Cu}]^a$ et $[\text{Cu}]^b$ seraient impliqués dans la CuAAC ([Worrell, Malik et al. 2013](#)).

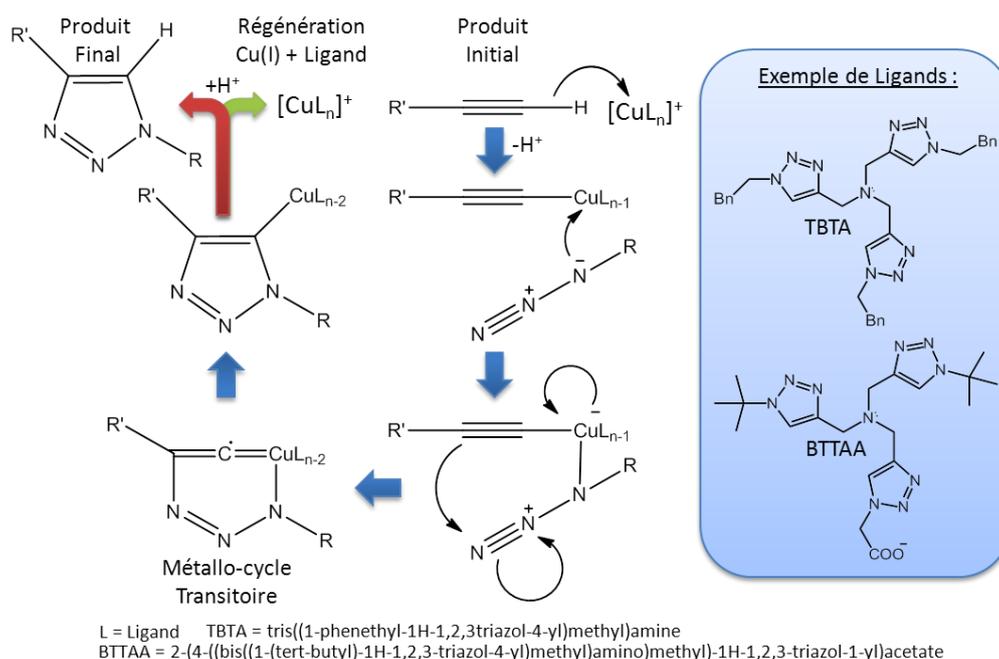


Figure 54 : Mécanisme réactionnel de de la CuAAC proposé par ([Rostovtsev, Green et al. 2002](#))

Description du mécanisme réactionnel de CuAAC et des différentes étapes intermédiaires. Les premières étapes illustrent l'intérêt du couple Cuivre-Ligand (Cu_{L_n}) dans le processus d'addition 1-3 dipolaire. Puis, la formation d'un métallo-cycle intermédiaire permet de former spécifiquement le cycle 1,4-triazole de liaison. Enfin, le Cu_{L_n} est régénéré pour la catalyse d'une nouvelle réaction. Les flèches de couleurs représentent des flèches réactionnelles classiques (\rightarrow).

B.1.3 Illustration de la SPAAc :

La SPAAc ne nécessite pas de catalyse au cuivre puisqu'elle utilise un cyclooctyne qui positionne la fonction alcyne dans un angle de 160° qui permet de diminuer la barrière énergétique d'activation de la réaction. Les cyclooctynes de première génération de la SPAAc possèdent une cinétique réactionnelle beaucoup moins performante que le couple azide/alcyne de la CuAAC. Cependant, la synthèse des molécules de seconde génération (cf. Figure 55) de la SPAAc (DIFO ([Codelli, Baskin et al. 2008](#)), DIBO ([Ning, Guo et al. 2008](#)), DIBAC ([Debets, van Berkel et al. 2010](#)), BARAC ([Jewett, Sletten et al. 2010](#))) réduit cet écart de performances cinétiques par un ajout de groupes fonctionnels électroattracteurs

supplémentaires qui accroissent la tension sur le cycle et facilitent la réaction. Le rendement total annoncé sur ces molécules est de 29% en moyenne mais leur synthèse est particulièrement difficile à cause de nombreuses étapes réactionnelles critiques. De plus, les cyclooctines sont relativement hydrophobes et souffrent de problèmes pharmacocinétiques comme la séquestration de celles-ci par des protéines sériques (ex: albumine) ou des réactions hors-cible avec des nucléophiles endogènes de type thiol ([Boyce and Bertozzi 2011](#)). Enfin, la SPAAC ne correspond pas parfaitement au concept de click-chemistry puisqu'elle n'est pas stéréo-sélective et que ses réactifs de départ ne sont pas disponible.

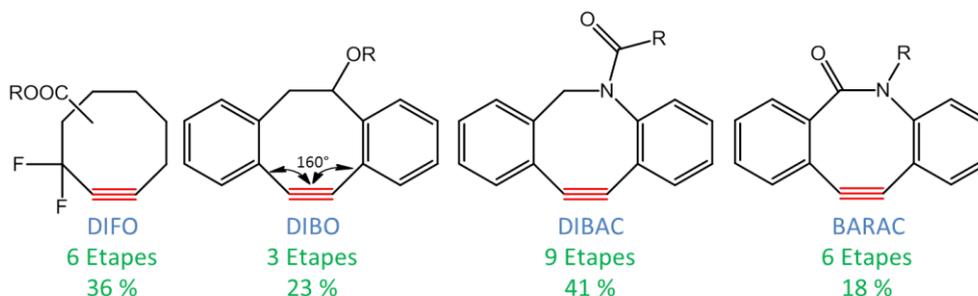


Figure 55 : Présentation des cyclooctines de seconde génération utilisées pour la SPAAC

Les principales molécules de SPAAC sont illustrées dans cette figure. Les noms des molécules sont indiqués en bleu et le nombre d'étape de synthèse et leur rendement respectif sont indiqués en vert. (DIFO = *difluorinated cyclooctyne* ; DIBO = *dibenzocyclooctyne* ; DIBAC = *aza-dibenzocyclooctyne* ; BARAC = *biarylazacyclooctynone*)

B.1.4 Applications de la CuAAC en Biologie :

Les applications biologiques de la CuAAC sont nombreuses et mettent en scène un couple de molécules distinctes de traceur-alcyne/sonde-azide ou de traceur-azide/sonde-alcyne. Le traceur est une molécule biologique modifiée par synthèse chimique pour ajouter un groupe alcyne ou azide. Ces modifications mineures ont été réalisées en biologie sur des monosaccharides, des acides aminés et des nucléotides (*cf.* Figure 56). Les modifications sont limitées en taille car elles ne doivent théoriquement pas perturber le métabolisme naturel du traceur. Le traceur d'intérêt est inoculé respectivement dans les embryons, les cellules ou les animaux vivants par des techniques de micro-injections, d'incubation ou de nutrition. Le traceur est ensuite internalisé et métabolisé dans les cellules de la même manière que son homologue naturel. Ainsi, les traceurs glycaniques sont métabolisés en nucléotide-sucres et s'accumulent dans le Golgi où ils seront transférés sur les glycoconjugués ; alors que les traceurs de nucléotidiques seront accumulés au niveau du noyau. Les traceurs biologiques intra-cellulaires sont spécifiquement reconnus par leurs sondes correspondantes qui se lient de manière covalente grâce à la réaction de CuAAC. Les sondes de différentes natures sont utilisées en fonction des applications envisagées.

La sonde-fluorescente permet de localiser et de quantifier le traceur par des techniques de microscopie ou de FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*). Plusieurs traceurs glycaniques ont été utilisés pour marquer les glycoconjugués et visualiser par des

sondes-fluorescentes dans des organismes eucaryotes et procaryotes avec succès : *Danio rerio* (Laughlin, Baskin et al. 2008; Baskin, Dehnert et al. 2010; Dehnert, Beahm et al. 2011), *Saccharomyces cerevisiae* (Breidenbach, Gallagher et al. 2010), *Mycobacterium tuberculosis* (Swarts, Holsclaw et al. 2012), les adenovirus (Banerjee, Ostapchuk et al. 2011), *Drosophila melanogaster* (Granell, Palter et al. 2011), *Caenorhabditis elegans* (Laughlin and Bertozzi 2009) et *Arabidopsis thaliana* (Anderson, Wallace et al. 2012), *Echerichia. Coli* (Dumont, Malleron et al. 2012).

La sonde d'affinité permet de purifier un type de biomolécule marquée par le traceur sur la durée d'incorporation grâce à une affinité spécifique (biotine-streptavidine) et d'un « linker » clivable pour éliminer la sonde après la purification (Salic and Mitchison 2008; Zheng, Jiang et al. 2013). Ainsi, un traceur de l'acide sialique permet de marquer les glycoprotéines sialylées bio-synthétisées durant le marquage et de purifier les sialoglycoprotéines marquées pour les analyser. Cette stratégie permet de visualiser les changements sialo-spécifiques d'un protéome sur un laps de temps précis (durée d'incubation du traceurs) et lors d'évènements particuliers comme la modification d'expression génique, l'infection ou la cancérogenèse.

La sonde-dirigeable est associée à un inhibiteur ou un antibiotique et va reconnaître spécifiquement le traceur complémentaire azide/alcyne dans un milieu complexe. Si le traceur complémentaire est uniquement présent à la surface des bactéries alors la sonde-dirigeable délivrera son principe actif à proximité de cette cible.

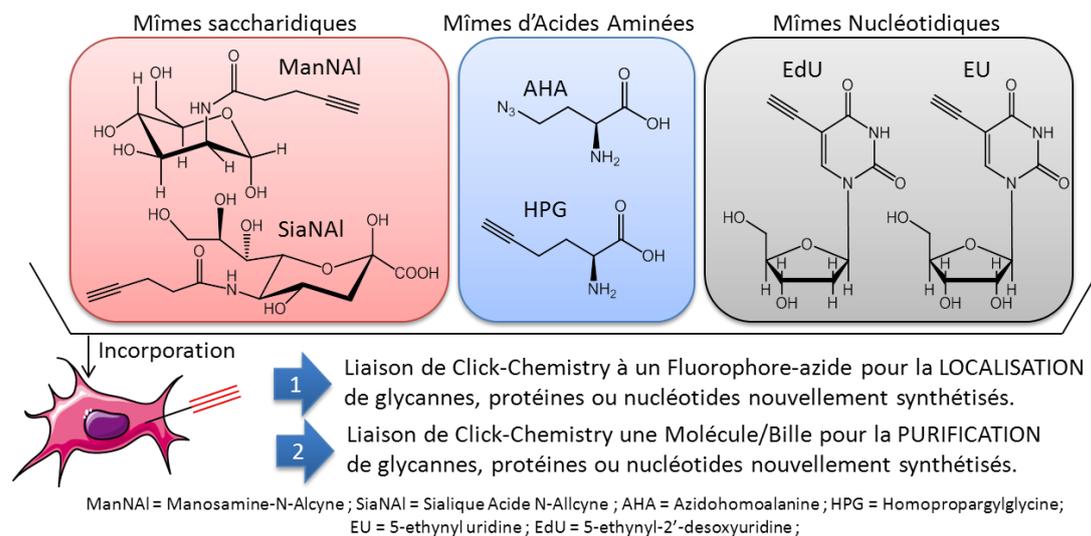


Figure 56 : Illustration des applications analytiques de la click-chemistry en glycobiologie
Présentation de molécules utilisées pour marquer les glycannes, les protéines et les acides nucléiques. Les principales utilisations en glycobiologie de ces molécules sont la localisation et la purification de glycoconjugués cellulaires ou tissulaire.

B.1.5 Aspects Cliniques de la Click-Chemistry en Glycobiologie :

Les applications thérapeutiques de la click-chemistry sont nombreuses car elles permettent de synthétiser un panel incroyable de molécules d'échafaudage très complexes exhibant plusieurs fonctions alcynes ou azides, qui pourront être fonctionnalisées par des molécules biologiques d'intérêts. Ces plateformes macromoléculaires de type dendrimère ou calixarène peuvent être couplées à des traceurs glycanniques pour réaliser des tests d'activités biologiques au niveau des interactions hôte-pathogènes ou de la stimulation du système immunitaire vis-à-vis d'antigènes spécifiques. Ces échafaudages entrent également dans la conception de sonde-dirigeable pour l'adressage de molécules spécifiques à visées thérapeutiques. Ces macromolécules permettent de piéger les agents pathogènes comme les virus ou les bactéries par des interactions glycanniques ([Barras, Martin et al. 2013](#)), ou de stimuler le système immunitaire dans le cadre de vaccins anti-cancéreux ou traditionnel (cf. Figure 57).

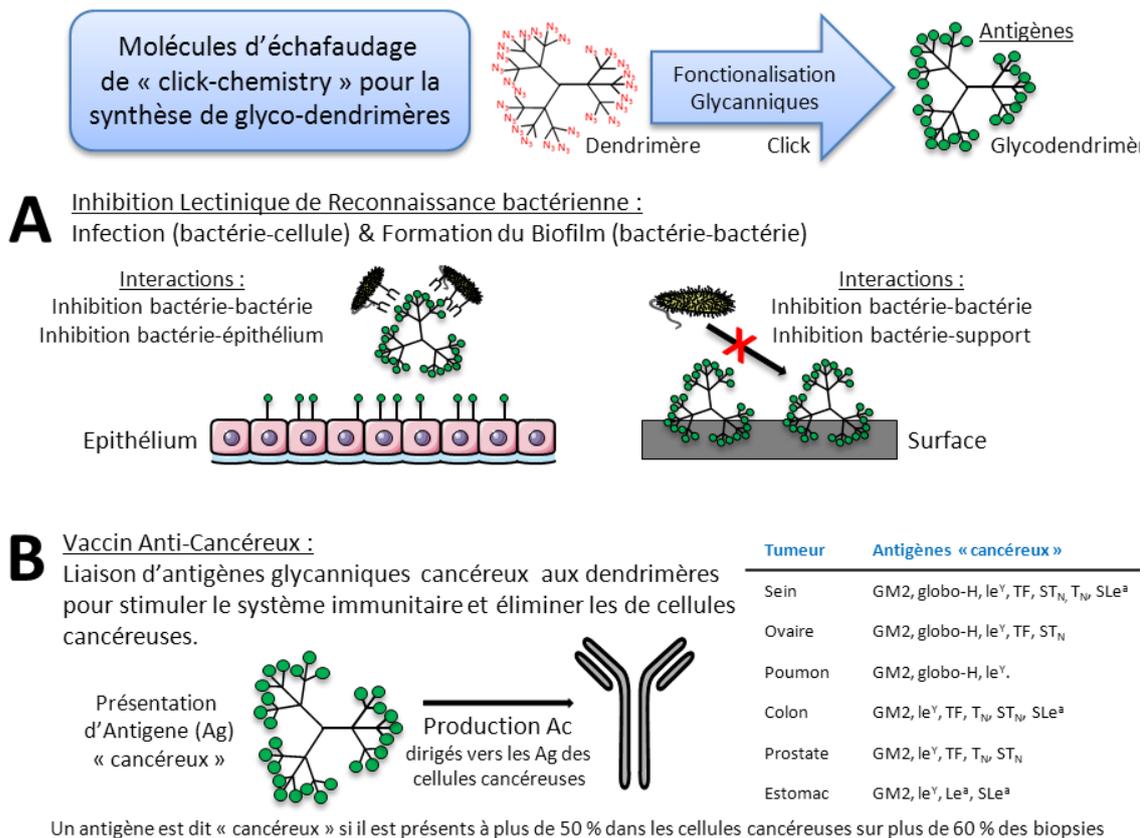


Figure 57 : Illustration des applications thérapeutiques de la click-chemistry en glycobiologie

Utilisation des glyco-dendrimères fonctionnalisés par des antigènes glycanniques spécifiques. Les antigènes sont fonctionnalisés par click-chemistry et servent à moduler les phénomènes d'interactions cellulaires et d'immunologie. (A) Antigène fonctionnalisé avec du Man réduit considérablement les interactions cellules-bactéries, bactéries-bactéries et surface-bactéries, ce qui diminue considérablement le risque d'infection et de formation de biofilm. (B) Certain antigène cancéreux fonctionnalisé permettent de stimuler le système immunitaire et de prévenir la formation de cancer.

Chapitre 2 : Génération des traceurs glycaniques alcynes

B.2.1 Nos objectifs :

Nous avons souhaité développer un panel complet de traceurs glycaniques de formes alcynes pour étudier l'incorporation et le recyclage de ces monosaccharides au niveau cellulaire par microscopie. Nous nous sommes focalisés sur la synthèse à partir d'un protocole établi ([Chang, Chen et al. 2009](#)) de sucres eucaryotes communs : la *N*-Alcyne-Mannosamine (ManNAI), l'acide sialique *N*-alcyne (SiaNAI), *N*-Alcyne-Glucosamine (GlcNAI), *N*-Alcyne-Galactosamine (GalNAI) et leurs versions acétylées. De plus, nous avons synthétisé une première sonde-azide de biotine-azide en suivant un protocole établi ([Hsu, Hanson et al. 2007](#)) pour reconnaître spécifiquement les traceurs glycaniques-alcynés incorporés dans les cellules. Nous avons également synthétisé un ligand de BTTAA pour la CuAAC d'après un protocole établi ([Besanceney-Webler, Jiang et al. 2011](#)) qui est beaucoup plus performant en termes de solubilité, de cinétique et de cytotoxicité. Ainsi, nous avons cherché à mettre en place les outils d'analyses métaboliques de la glycosylation eucaryote à l'aide de la synthèse de différentes molécules de traceurs glycaniques alcynés, d'une sonde et d'un ligand de BTTAA. Enfin, nous avons testé ces produits sur les cellules ZFL et sur les cellules MCF-7 en microscopie confocale de fluorescence.

B.2.2 Introduction :

Les couples de molécules azides/alcyne réagissent par click-chemistry en milieu biologique en formant une liaison covalente spécifique. Ainsi, un traceur intracellulaire de sucre-alcyne peut être reconnu spécifiquement par une sonde de biotine-azide qui est reconnue ensuite par une streptavidine couplée à un fluorophore pour l'observation de ce complexe en microscopie de fluorescence. Nous avons utilisé cette stratégie en deux temps (liaison traceurs/sonde, puis reconnaissance biotine/streptavidine-fluo) pour observer le SiaNAI dans les cellules ZFL. Nous avons ensuite opté pour une stratégie directe utilisant une sonde-azide fluorescente d'origine commerciale (Azide-fluor 545) pour marquer les traceurs glycaniques en une seule étape de click chemistry. Nous avons privilégié cette stratégie directe pour l'ensemble des expériences de marquages glycaniques en microscopie de fluorescence. Dans un souci d'amélioration, nous avons utilisé un ligand commercial de TBTA (particulièrement peu soluble dans l'eau) pour nos premiers tests de marquage des cellules ZFL, puis nous avons utilisé notre ligand de BTTAA pour la suite des manipulations puisque celui-ci est beaucoup plus performant. Nous allons dans cette partie décrire les différentes synthèses que nous avons effectuées ainsi que les étapes de caractérisation des produits par

RMN et MS. Enfin, nous décrivons les premiers tests effectués sur cet ensemble de sucres-alcyne.

B.2.3 Présentation des synthèses :

Dans le cadre de la CuAAC, nous avons synthétisé les 10 suivantes : ManNAI, GlcNAI, GalNAI, SiaNAI, Ac4-ManNAI, Ac4-GlcNAI, Ac4-GalNAI, Ac4-SiaNAI, Biotine-Azide et le BTAA (cf. Figure 58). Les synthèses des N-alcyne-hexosamines suivent des procédés similaires mais utilisent un monosaccharide de départ différent : mannosamine hydrochloride, galactosamine hydrochloride, glucosamine hydrochloride ([Chang, Chen et al. 2009](#)). L'acide sialique *N*-alcyne est obtenu *in vitro* par la réaction enzymatique ([Chang, Chen et al. 2009](#)) de la Neu5Ac aldolase sur le ManNAI. Le ligand de BTAA et la Biotine-Azide sont issus de différents protocoles de synthèses, respectivement ([Besanceney-Webler, Jiang et al. 2011](#)) et ([Hsu, Hanson et al. 2007](#)). Nous allons maintenant détailler les étapes réactionnelles et la caractérisation des produits obtenus.

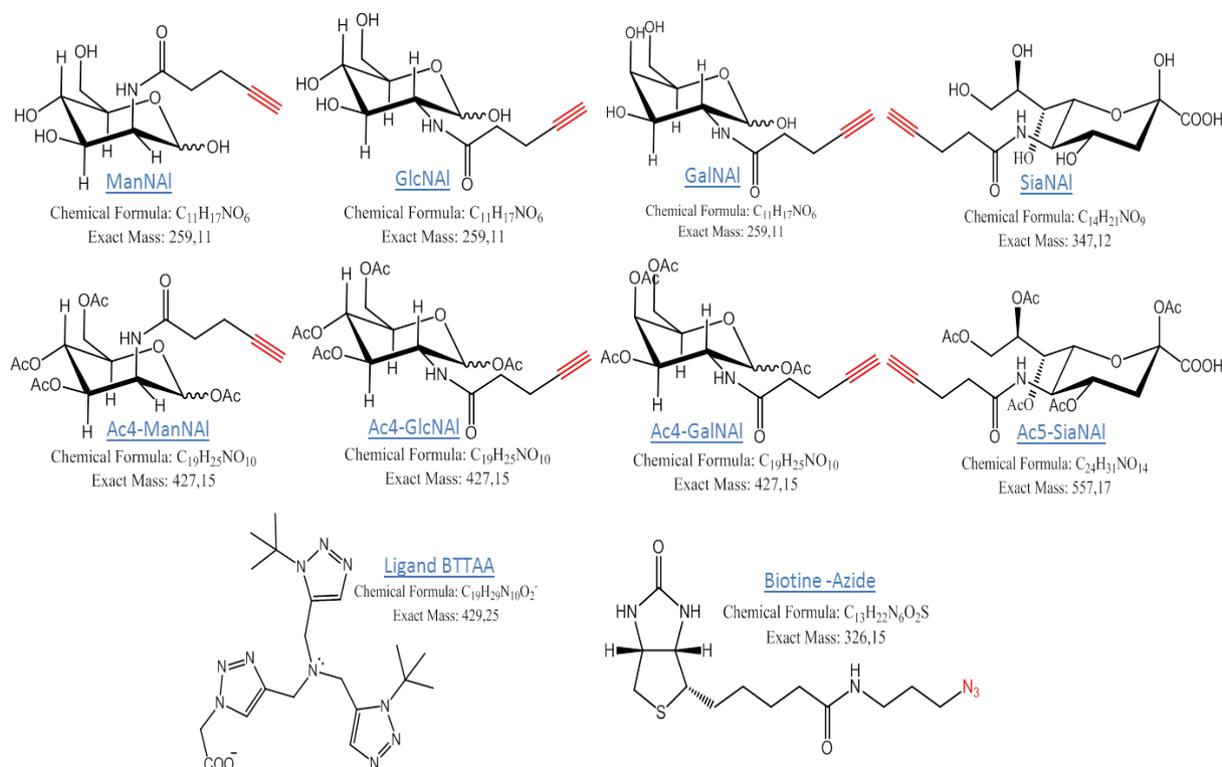


Figure 58 : Synthèse de molécules impliquées dans la réaction de CuAAC.

B.2.3.1 Synthèse des monosaccharides-alcynes :

La formation des sucres-alcynes (ManNAI, GlcNAI, GalNAI) se déroule en deux étapes successives sans purification intermédiaire mais avec une purification finale sur colonne de silice par chromatographie-*flash* (cf. Figure 59).

La première étape vise à former du 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl-pent-4-ynoate (*N*-succinimidyl-ester) qui possède un excellent groupe partant d'acide 4-pentynoate (ester activé). La triéthylamine (TEA) est une base faible utilisée lors de cette réaction pour capter les protons acides du *N*-hydroxysuccinimide et de l'acide 4-pentynoïque. Le DCC est un agent de couplage qui active l'acide pent-4-ynoïque et favorise la substitution nucléophile nécessaire à la formation du *N*-hydroxysuccinimidyl-ester. La réaction se déroule à température ambiante dans du THF anhydre pendant 6 heures et offre un rendement supérieur à 80 %. Lors de cette réaction, un précipité réactionnel d'urée issu de la DCC se forme naturellement dans le THF et peut être éliminé par filtration avant de collecter le *N*-succinimidyl-ester dans l'éluât par évaporation.

La deuxième étape utilise directement un mélange (2:3) de *N*-succinimidyl-ester et d'une hexosamine chlorhydrate commerciale dans du MeOH/THF (v/v ; 1:1) anhydre à température ambiante sous flux d'azote et sous agitation pendant 16 heures. Une purification sur colonne de silice en chromatographie-*flash* est nécessaire pour purifier les monosaccharides alcynes d'intérêt. L'éluât s'effectue sur une colonne de silice de 20 g grâce à un mélange de CHCl₃/MeOH évoluant linéairement de 100/0 à 50/50 (%) sur 100 minutes à un débit de 3 mL par minute. Les monosaccharides-alcynes purifiés ont été visualisés par pulvérisation d'orcinoïl sulfurique à 20 % sur une plaque de silice. Les fractions d'intérêts identifiées ont été rassemblées et concentrées pour les analyser en spectrométrie de masse et RMN afin de contrôler leur pureté et d'établir le rendement réactionnel. Les rendements de ces réactions dépendent du monosaccharide d'intérêt synthétisé : la GlcNAI (54%), la GalNAI (67 %) et la ManNAI (71 %).

La biosynthèse du SiaNAI est réalisée par voie enzymatique en utilisant de la 25U de Neu5Ac Aldolase dans l'eau pendant 12 heures à pH 7,4 et à 37°C en présence de 50 mmol phosphate de potassium, de 1.1 mmol de ManNAI (substrat accepteur) et de 1.1 mmol de pyruvate de sodium (substrat donneur). Le SiaNAI est ensuite purifié sur une colonne d'échange d'anions de type AG1-X2 (BIORAD) par un gradient d'acide formique de 1 à 2,5 M. Le SiaNAI est initialement retenu sur la résine grâce à sa charge négative, alors que les réactifs sont élués. Le SiaNAI est ensuite élué par l'augmentation de la concentration en acide formique. L'utilisation d'orcinoïl sulfurique par pulvérisation sur plaque de silice permet d'identifier les fractions d'intérêt afin de les caractériser. Nous avons obtenu un rendement de 35 % lors de cette biosynthèse.

La per-acétylation des monosaccharides-alcynes est une étape rapide et efficace, qui s'effectue par ajout d'anhydride acétique pur et d'une goutte de pyridine à 100°C pendant 4 heures sur un échantillon lyophilisé. Le rendement de cette réaction est d'environ 90 %. Les échantillons acétylés peuvent être facilement isolés du mélange réactionnel par une extraction de phase de type chloroforme/eau.

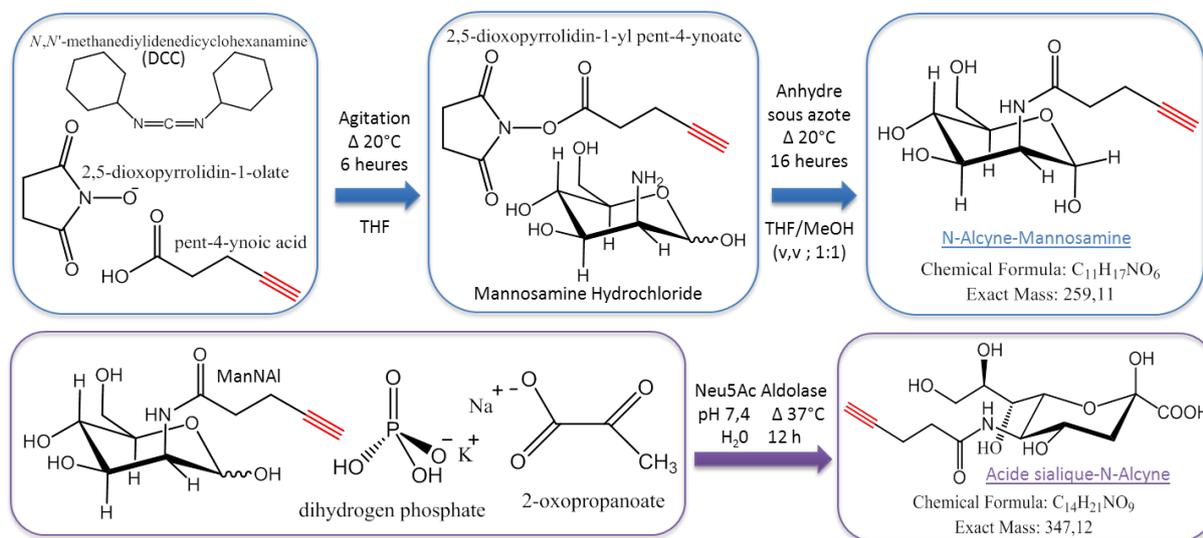


Figure 59 : Schéma de synthèse des sucres-alcynes.

Les flèches de couleurs représentent des flèches réactionnelles classiques (\rightarrow).

La synthèse de la biotine-azide (ou 3-azidopropyl biotine amide) s'effectue en une seule étape réactionnelle, en mélangeant la d(+)-biotine (100 mg), le 1-azido-3-aminopropane (82 mg), la O-(benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetraméthyluronium hexafluorophosphate HBTU (311 mg), et la N,N-diisopropylethylamine (106 mg) dans 5 mL de DMF à température ambiante et sous agitation pendant 2 heures. Le mécanisme réactionnel se décompose en 3 étapes successives (cf. Figure 60) qui commence par l'ionisation de la d(+)-biotine grâce à une base faible dipropyl-éthylamine. La d(+)-biotine ionisée va attaquer le HBTU pour former un excellent groupe partant (ester activé) et libérer une molécule d'urée. Cette nouvelle structure va alors subir une substitution nucléophile de la part du 1-azido-3-aminopropane permettant de former la biotine-azide. Lors de cette réaction, nous avons obtenu un rendement de 45 % après la purification par chromatographie-*flash* sur silice.

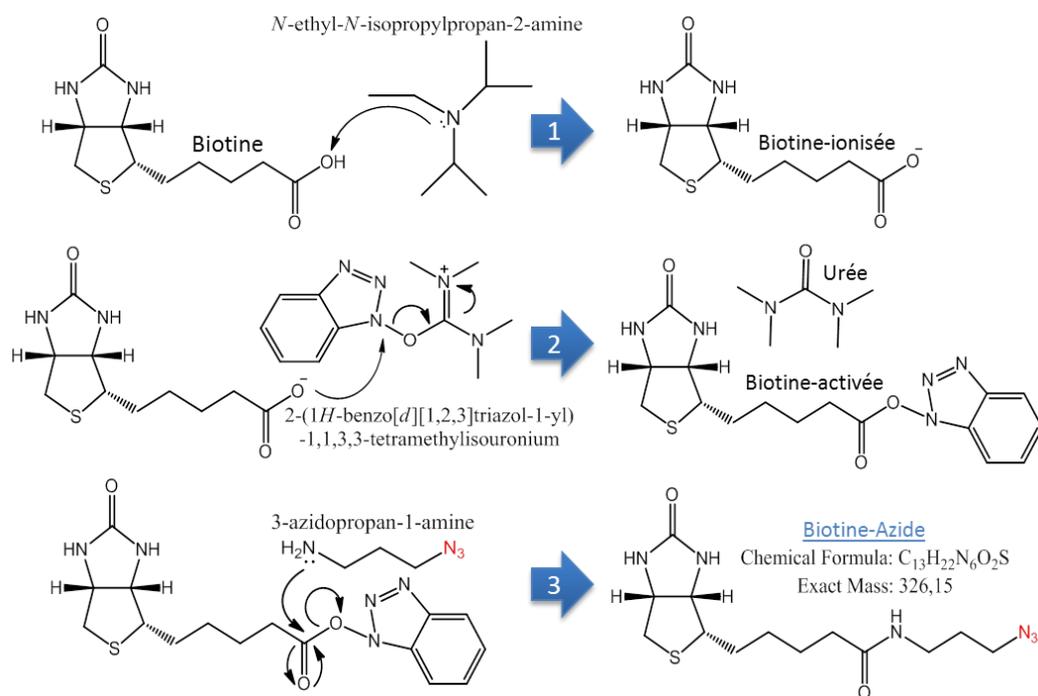


Figure 60 : Mécanisme réactionnel de la synthèse de la biotine-Azide.
 Les flèches de couleurs représentent des flèches réactionnelles classiques (\rightarrow).

B.2.3.2 Biosynthèse du Ligand de BTAA :

La synthèse d'un nouveau ligand de click-chemistry, beaucoup plus performant au niveau des paramètres cinétiques et cytotoxiques de la CuAAC en milieu biologique, est rapidement devenue une question primordiale pour nos études. Nous nous sommes naturellement intéressés au ligand dont les performances et la voie de synthèse étaient les meilleures. Ainsi, nous avons décidé de synthétiser le BTAA ou 2-(4-[(bis[(1-*tert*-butyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amino)methyl]-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl) Acetic Acid, qui possède une fonction carboxylique qui lui confère une meilleure solubilité dans l'eau et de meilleures capacités de captation du cuivre par rapport au premier ligand historique de la CuAAC, le TBTA ([Besanceney-Webler, Jiang et al. 2011](#)).

La synthèse du BTAA s'effectue en 5 étapes successives (cf. Figure 61) nécessitant de simples purifications par extraction de solvant ou par chromatographie *flash* sur silice.

La première étape est une substitution nucléophile d'ordre 1 qui fait réagir le 2-méthylpropane-2-ol avec l'acide sulfurique en milieu aqueux à température ambiante pour former un carbocation tertiaire stable qui va réagir directement avec l'azoture de sodium pour former le 2-azido-2-méthylpropane. La seconde étape est une réaction de *click-chemistry* de CuAAC entre le 2-azido-2-méthylpropane et le 3,3-diéthoxyprop-1-yne qui forme le 1-(*tert*-butyl)-4-(diéthoxyméthyl)-1*H*-1,2,3-triazole. La troisième étape est l'hydrolyse de l'acétal en présence de l'acide trifluoroacétique qui transforme cette fonction

en héli-acétal puis en aldéhyde. Cette réaction forme le 1-(tert-butyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carbaldehyde. La quatrième étape est un processus d'amination-réductrice. L'amine primaire de la prop-2-yn-1-amine va attaquer l'aldéhyde du 1-(tert-butyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carbaldehyde par un mécanisme d'amination. La première imine formée est alors réduite en amine secondaire par le triacétoxyhydroborate de sodium permettant une nouvelle réaction d'amination avec l'aldéhyde du 1-(tert-butyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carbaldehyde. Cette seconde imine formée est réduite à nouveau par le triacétoxyhydroborate de sodium en amine tertiaire qui ne peut plus former d'imine. Ces réactions aboutissent à la formation du N,N-bis((1-(tert-butyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)méthyl)prop-2-yn-1-amine. La cinquième étape est une réaction de *click-chemistry* de CuAAC entre le N,N-bis((1-(tert-butyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)méthyl)prop-2-yn-1-amine et le 2-azidoacétate formant le ligand de BTAA. Le rendement final obtenu lors cette synthèse est d'environ 60%.

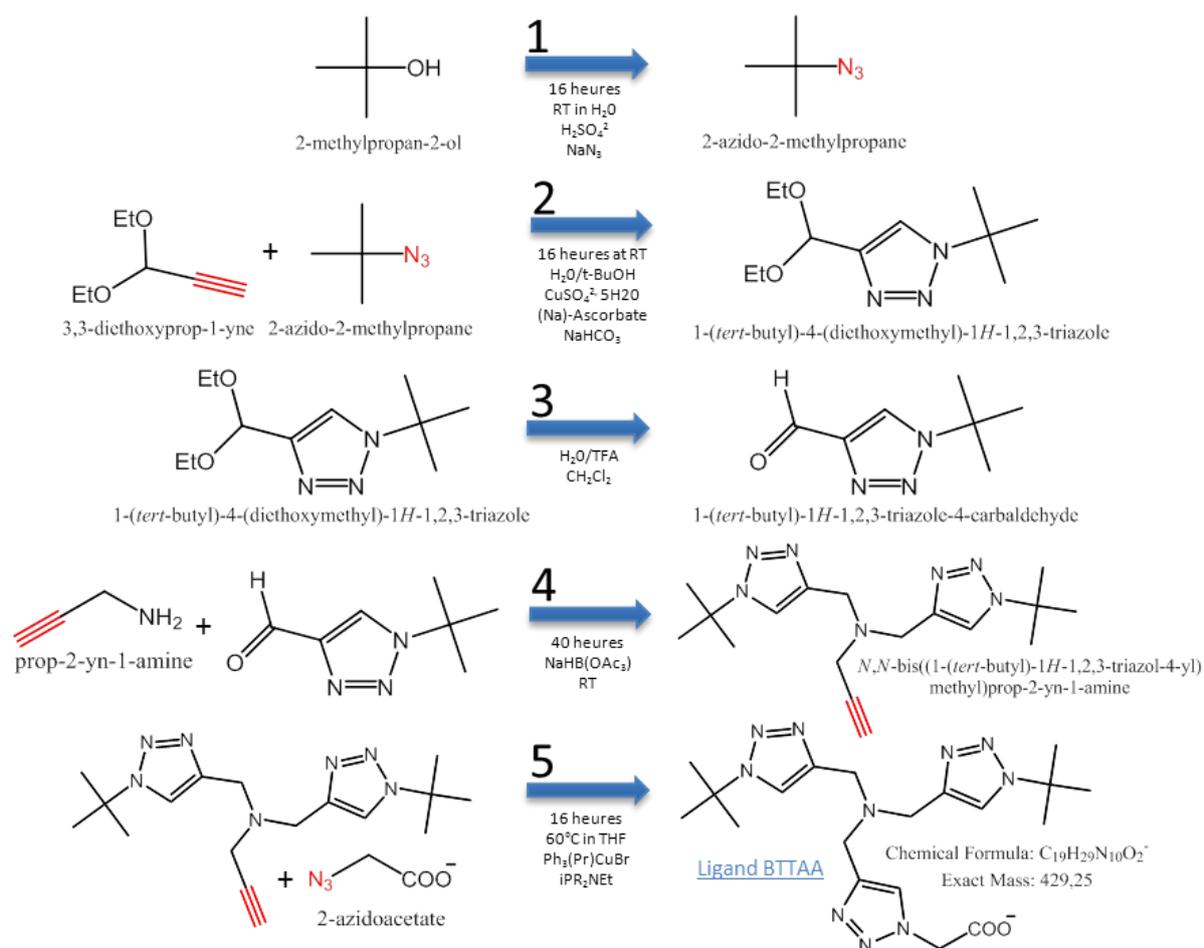


Figure 61 : Mécanisme réactionnel de la synthèse du Ligand (BTAA).
Les flèches de couleurs représentent des flèches réactionnelles classiques (→).

B.2.4 Caractérisations :

Afin d'identifier nos produits d'intérêt et de certifier de leurs excellents niveau de pureté, nous avons réalisé des analyses de spectrométrie de masse par MALDI-TOF et de Résonance magnétique nucléaire (RMN) sur un spectromètre de 400 MHz.

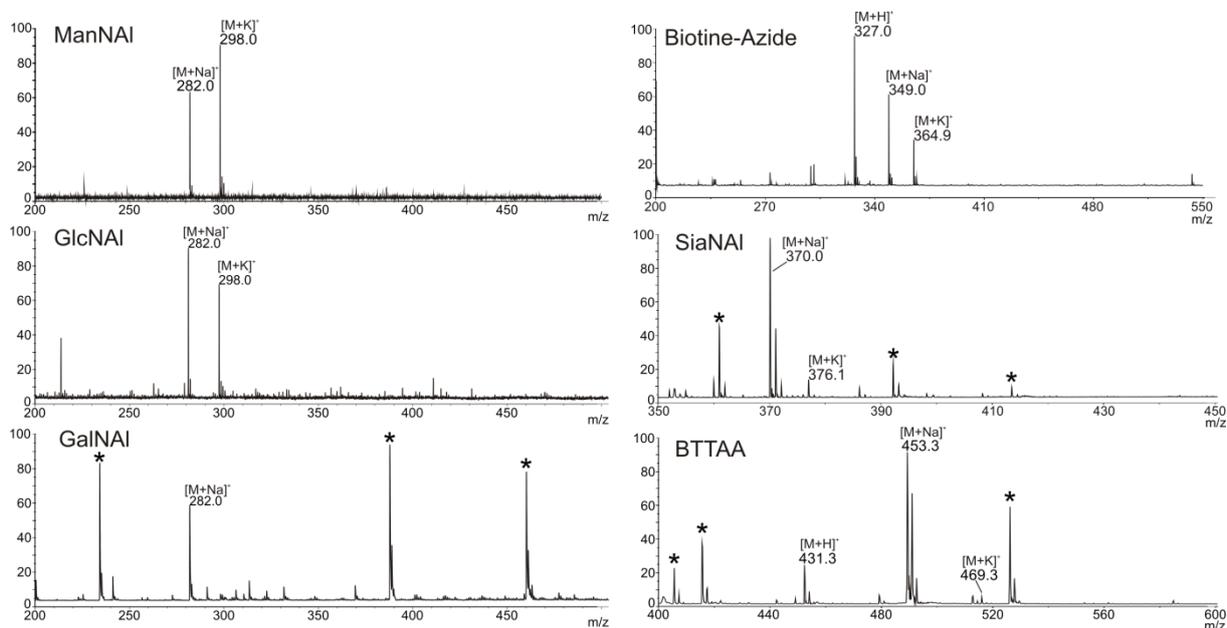


Figure 62 Analyses de MALDI-TOF-MS de nos produits de synthèses pour Click-Chimie.

Présentation des profils MS des produits de synthèses après purification : ManNAI, GalNAI, GlcNAI, Biotine-Azide, SiaNAI et BTAA. Les symboles suivants (*) représentent des contaminations qui sont imputables aux signaux de matrice.

Nous avons pu confirmer par spectrométrie de masse que l'ensemble de nos produits de synthèse avait exactement la masse attendue. Ainsi, les *N*-Alcyne-Hexosamines sont tous observés sous les formes $[M+Na]^+$ à m/z 282 et $[M+K]^+$ à m/z 298. Les spectres MS montrent une grande pureté des composés synthétisés et seuls quelques signaux de matrices (*) que nous avons identifiés grâce à une analyse MS de la matrice DHB.

Nous avons également testé les composés synthétisés en RMN 400 MHz Liquide dans du D_2O . Les déplacements chimiques des spectres RMN proton et carbone à une dimension ont été comparés aux données de la littérature et correspondent parfaitement avec les produits que nous avons synthétisés. Nous avons de plus attribué l'ensemble des signaux à leurs protons ou carbones correspondants. Ces analyses montrent elles aussi que les produits que nous avons synthétisés sont clairement identifiés et qu'ils sont purs.

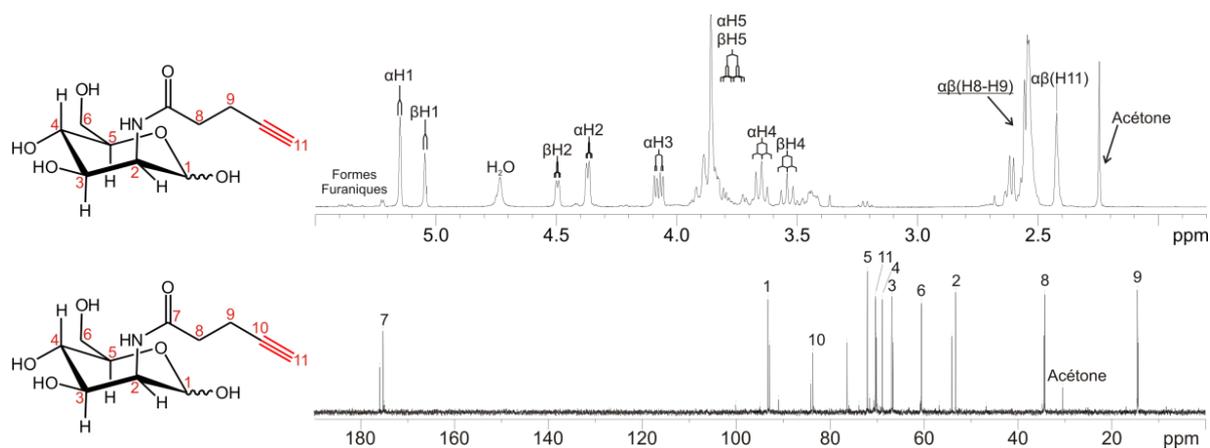


Figure 63 : Spectre RMN proton et carbone 1D du ManNAI

Le spectre RMN proton du ManNAI (partie supérieur) a été réalisé dans le D₂O et permet de visualiser clairement les deux doublets à 5,05 et 5,15 ppm correspondant respectivement aux signaux α H₁ et β H₁ (60/40). Le spectre RMN carbone du ManNAI (partie inférieure) montre bien l'ensemble des carbones de la molécule que nous avons pu attribuer par rapport aux données de références et aux déplacements chimiques des groupes chimiques. L'ensemble des signaux a pu être attribué et fait référence au numéro des atomes inscrits sur la structure adjacente au spectre.

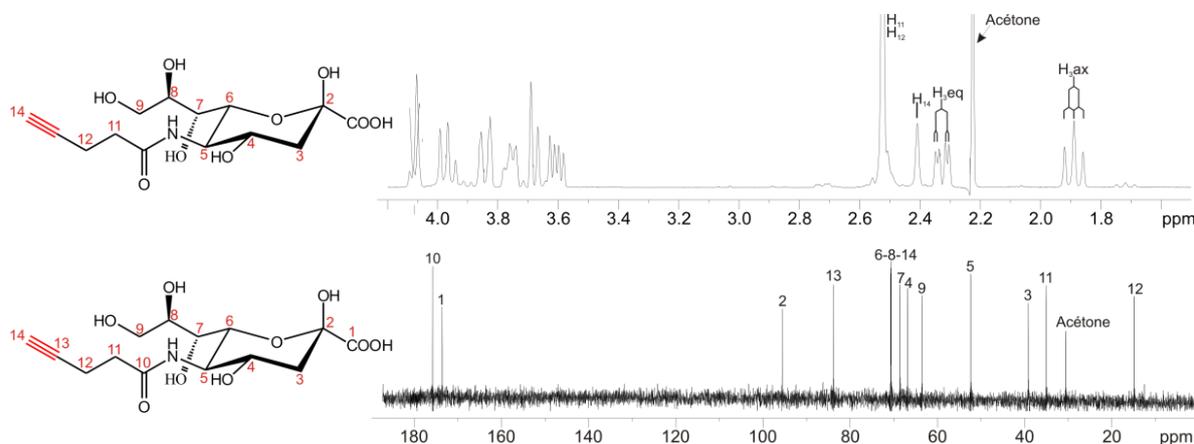


Figure 64 : Spectre RMN proton et carbone 1D du SiaNAI

Les spectres RMN proton et carbone ont été réalisés dans le D₂O et nous avons pu visualiser sur le spectre proton les déplacements chimiques caractéristiques de l'acide sialique, à savoir le triplet H₃-axial (δ H = 1,90) et le quadruplet équatorial (δ H = 2,32), ainsi que les signaux introduits par l'acétylène des protons H₁₁, H₁₂ et H₁₄. Le spectre carbone illustre parfaitement la molécule avec les carbones 10 (δ C = 176,6) et 1 (δ C = 174,3) qui sont les plus déblindés et le carbone 12 (δ C = 17,5) qui lui est le plus blindé. Ensemble, ces spectres confirment l'identité et la pureté moléculaire du SiaNAI.

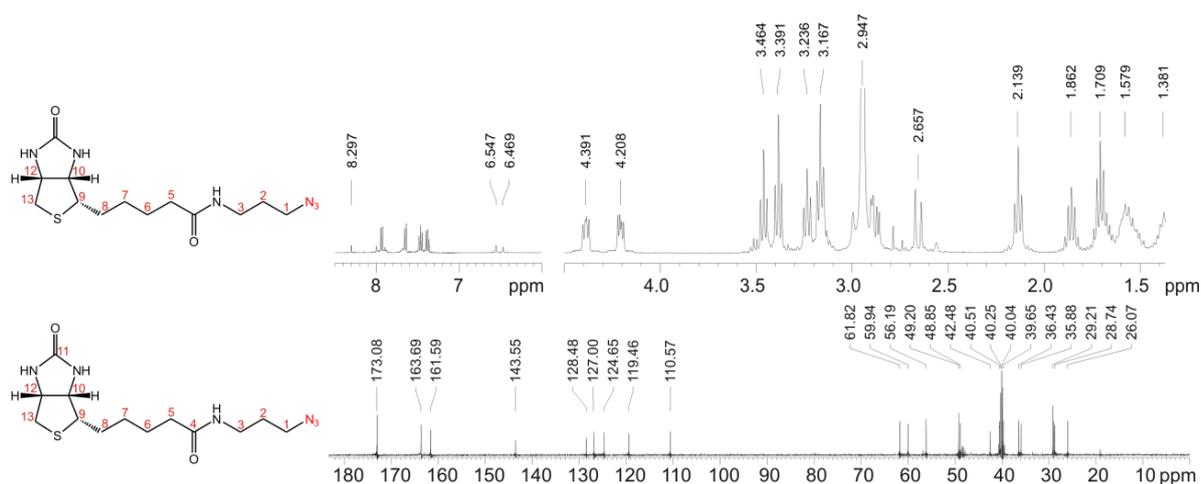


Figure 65 : Spectre RMN proton et carbone 1D de la Biotine-Azide

Les spectres RMN proton et carbone de la biotine-azide sont en accord avec les données de déplacement chimique de la bibliographie ([Hsu, Hanson et al. 2007](#)). La molécule possède un niveau suffisant de pureté pour être utilisé bien que la présence de certains réactifs comme l'urée soit également détectables.

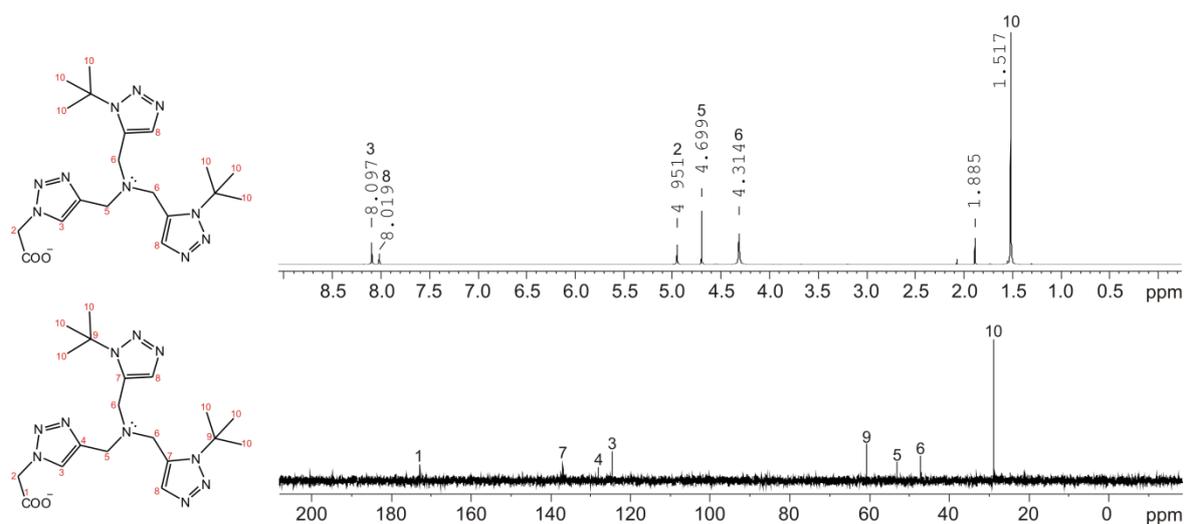


Figure 66 : Spectre RMN proton et carbone 1D du BTTAA

Les spectres RMN proton et carbone du BTTAA dans le D₂O sont relativement simples puisque beaucoup de protons et de carbones ont exactement les mêmes propriétés électromagnétiques et occupent du fait les mêmes déplacements chimiques. Ainsi, le pic numéro 10 des groupes méthyles représente 18 protons ou 6 carbones sur les spectres correspondants et sont dans les deux cas fortement blindés. Cette analyse confirme la réussite de la synthèse et l'état de grande pureté du produit.

B.2.5 Tests de marquage par microscopie des sucres-alcynes :

Nous avons commencé les tests d'incorporation et de microscopie sur les cellules ZFL par incubation dans le milieu de culture de 300 μ M de SiaNAI pendant 48 heures. Pour la microscopie, les cellules ont été lavées au PBS et fixées à l'acétone -20°C durant 10 min. Ensuite nous avons réalisé la réaction de *click-chemistry* (CuAAC) entre le SiaNAI et la biotine-azide à l'aide du tampon de 0.1 mM de Biotine-Az, 0.1 mM de TBTA, 2 mM de CuSO₄ dans du PBS, que nous avons appliqué sur les cellules fixées à température ambiante durant 30 min. Enfin, nous avons lavé les cellules marquées au PBS et nous avons couplé la biotine à la *fluorescein-streptavidine* en préparant une solution de PBS contenant 5% de BSA et 2 μ g/mL de fluorescein-streptavidine. Les résultats que nous avons obtenus montrent un marquage important de la membrane plasmique des cellules ZFL.

Ensuite, nous avons voulu savoir dans quels sialo-conjugués le SiaNAI s'incorpore préférentiellement et s'il en était de même pour un acide sialique naturel (Neu5Ac) d'origine exogène. Le SiaNAI et l'ensemble des acides sialiques naturels peuvent être dérivés par le DMB (1,2-diamino-4,5-méthylènedioxybenzène), ce qui les rend fluorescents. Les dérivés DMB des acides sialiques peuvent être identifiés et quantifiés par HPLC à fluorescence. Ce qui nous a permis de déterminer que le SiaNAI comme le Neu5Ac s'incorporent préférentiellement dans les sialo-glycoprotéines des cellules ZFL.

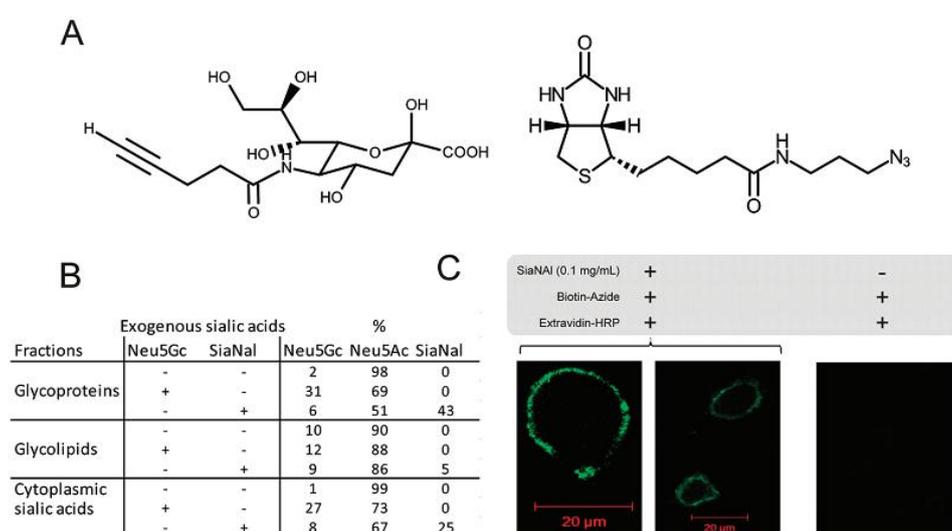


Figure 8. Metabolic labeling of sialylated glycoconjugates by unnatural sialic acids. (A) Alkyne-labeled sialic acid and biotin azide were synthesized and used to probe the metabolic labeling of glycoconjugates. Structural analyses of synthesized molecules are presented in Figure S1 and S2 (Supporting Information). (B) Incorporation efficiency of unnatural exogenous alkyne-labeled sialic acids and natural Neu5Gc was established by HPLC. (C) Observation of cell surface localization of labeled sialylated glycoconjugates by confocal microscopy.

(cf. Article partie A)

Suite à nos synthèses de sucre-alcynes, nous avons voulu tester leurs incorporations et leurs marquages dans les cellules MCF-7. Nous avons donc ajouté 1 mM de sucres-alcynes acétylés ou non dans le milieu de culture des cellules MCF-7 durant 48 heures. Puis, nous avons fixé les cellules au PAF (para-formaldéhyde) à 4% dans du PBS. Afin de marquer les sucres-alcynés, nous avons utilisé une solution de CuAAc constituée de : 100 mM de KH_2PO_4 (ajusté à pH 7.4 avec de l'acide hydrochloride 100 mM), 2.5 mM ascorbate, 50 μM de CuSO_4 pentahydrate, 300 μM de BTAA et de 100 μM d'azide fluor 545. Nous avons appliqué cette solution pendant 15 mn à température ambiante sur les cellules MCF-7 fixées puis nous avons lavé les cellules au PBS et nous avons réalisé un marquage au DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole) pour marquer les bases Adénines (A) et Thymines (T) de l'ADN.

Les résultats (cf. Figure 67) sont particulièrement intéressants, puisque nous observons dans les conditions expérimentales des résultats différents en fonction de l'acétylation ou non de nos sucres-alcynés. En fait, l'acétylation des sucres-alcynés leur permet de diffuser librement à travers la membrane plasmique et de se retrouver libres dans le cytosol où des enzymes cellulaires naturelles les dé-acétylent, afin de les utiliser dans le métabolisme des glycanes. Les tests réalisés sur l'acide sialique alcyne (SiaNAI) et son précurseur métabolique (ManNAI) montrent clairement que ces composés sont capables d'entrer dans les cellules MCF-7, qu'ils soient acétylés ou non. *A contrario*, la GalNAI et la GlcNAc sont incapables d'entrer dans les cellules MCF-7 si elles ne sont pas acétylés. Cette observation surprenante incrimine un mécanisme d'entrée sélectif de l'acide sialique et du ManNAI dans les cellules MCF-7, qui soit capable de distinguer les différentes configurations des *N*-Alcynes-Hexosamines.

En outre, nous distinguons des marquages très différents en fonction de l'acétylation ou non des produits dans les cellules MCF-7. En effet, les composés acétylés marquent l'ensemble de la cellule de manière homogène dans un premier temps (Acétyl-GalNAI/Acétyl-GlcNAI) qui évolue progressivement vers un marquage vésiculaire, Golgien et membranaire (Acétyl-SiaNAI/Acétyl-ManNAI). Cette évolution du marquage est principalement due à l'accumulation de sucres-alcynés acétylés, qui doivent d'abord être dé-acétylés avant d'être métabolisés. Ce phénomène est particulièrement marqué puisque nous avons utilisé des quantités importantes de sucres-alcynés acétylés (1 mM) lors de l'incubation sur les cellules MCF-7. Les composés non-acétylés de ManNAI et de SiaNAI sont directement incorporés et métabolisés, ils montrent un marquage similaire au niveau des membranes plasmiques des cellules MCF-7.

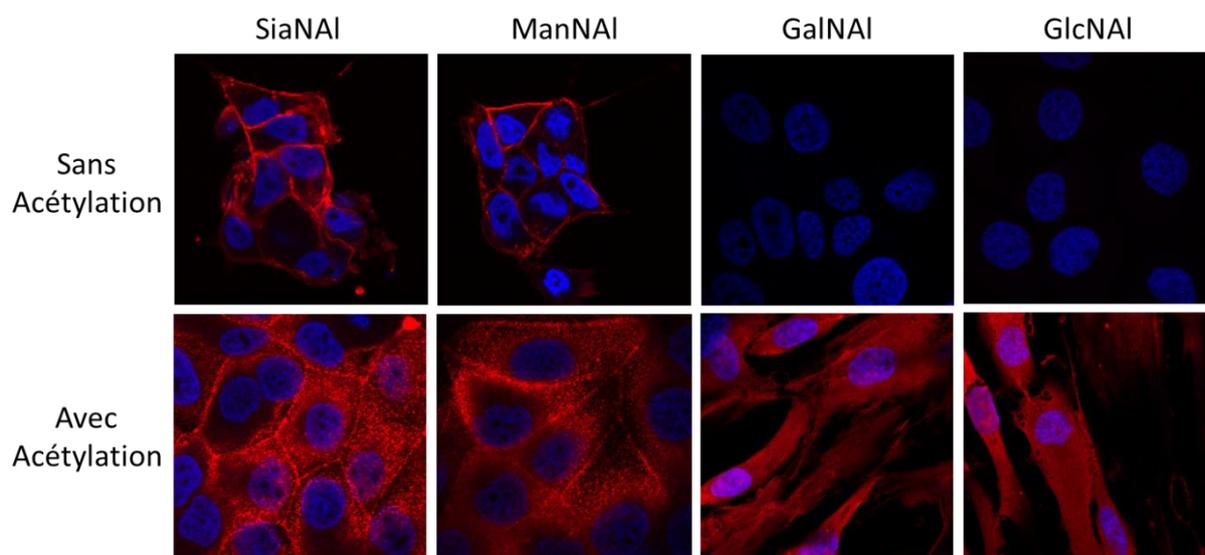


Figure 67 : Test d'incorporation des produits synthétisés dans les cellules MCF-7 en microscopie confocale. Nous avons réalisé les incubations de nos produits à 1 mM pendant 48 heures dans le milieu de culture des cellules MCF-7 que nous avons observées en microscope confocale à fluorescence après leurs fixations au PAF à 4% et leurs marquages par click-chemistry avec le Azide-Fluor 545.

Les tests métaboliques de nos produits de synthèses nous ont permis de visualiser le marquage des sucres-alcyne acétylés et non-acétylés dans les cellules MCF-7. Nous avons choisi d'étudier le métabolisme de l'acide sialique dans différentes conditions pathologiques (CDG et Infection parasitaire) dans des fibroblastes humains dans lesquels nous avons utilisé le SiaNAI non acétylé pour deux principales raisons. La raison principale est que nous avons cherché à visualiser directement le métabolisme de l'acide sialique et que nous n'avons pas souhaité éliminer l'étape d'incorporation de l'acide sialique et rajouter une étape supplémentaire de dé-acétylation. La seconde raison est basée sur le processus de dé-acétylation qui libère de l'acide acétique libre qui augmente l'acidité du cytoplasme, ce qui pourrait perturber le trafic cellulaire. Enfin, les traceurs acétylés sont très peu solubles dans l'eau et nécessitent l'ajout de DMSO (0.5%) pour les solubiliser dans le milieu de culture, ce qui peut également perturber l'état physiologique des cellules.

Chapitre 3 : Conclusions

Nous avons synthétisé, purifié et caractérisé un panel de traceurs de sucre-alcynes, d'un ligand de BTTAA et d'une sonde-azide dans le but de visualiser le métabolisme des sucres au niveau cellulaire. Les premiers résultats sur les cellules ZFL et ceux réalisés sur les cellules MCF-7 montrent que nos produits de synthèses sont bien incorporés dans les cellules et nous permettent par différentes stratégies de visualiser leur incorporation au niveau cellulaire. Les résultats sur les cellules MCF-7 apportent de précieuses informations sur les mécanismes d'incorporation et de métabolisation des sucres-alcynes acétylés ou non. Ce sont donc d'excellents outils pour imager le métabolisme d'un glycanne particulier au niveau cellulaire et moléculaire.

Ces outils sont « multifonctionnels » puisqu'ils peuvent également servir à développer des techniques de marquage ou de purification de glycoprotéines par click-chemistry. En effet, il est possible de récupérer des glycoprotéines cellulaires ayant incorporé un sucre-alcyné et de le coupler par click-chemistry à une sonde-azide permettant de purifier les protéines marquées ou de les identifier dans un gel SDS-PAGE par fluorescence. La maîtrise des techniques de synthèse et purification de traceurs alcynes nous permet d'envisager la synthèse de composés plus complexes (nucléotides-sucres-alcynés ou des cyclooctines) ou plus performants que nous souhaiterions développer. La maîtrise des synthèses d'analogues glycaniques est d'ailleurs à l'œuvre puisque nous synthétisons actuellement des sucres spécifiques tels que l'arabinose, le rhamnose et l'acide sialique de type KDO.

L'émergence récente de ces techniques de marquage et de purification des glycoconjugués dans les laboratoires de biochimie a rapidement été suivie par une commercialisation de kit de « click-chemistry » ciblant les monosaccharides, les protéines et l'ADN. Ces techniques de glycobiologie basées sur la click-chemistry sont en voie de « démocratisation » et sont devenues l'alternative principale des techniques de marquages radioactifs qui sont encore extrêmement contraignantes.

Les outils de glycobiologie que nous avons synthétisés ont permis de développer plusieurs thématiques sur le traçage de l'acide sialique dans les fibroblastes de patients CDG ou lors d'infections par le parasite de *Toxoplasma gondii* que nous avons développées dans la Partie C.

PARTIE C

PARTIE C : Rôles physiologiques et métaboliques de l'acide sialique associé à diverses pathologies

Chapitre 1 : Métabolisme et incorporation de l'acide sialique

C.1.1 Introduction :

L'acide sialique est un ose dérivé présent sous de nombreuses formes ([Varki and Varki 2007](#)) ; il est bio-synthétisé *de novo* chez les eucaryotes et les procaryotes par la voie des hexosamines ([Li and Chen 2012](#)). Dans le cas des eucaryotes (*cf.* Figure 68) la voie des hexosamines débute par la conversion de la glucosamine-6-phosphate (GlcN6P) en UDP-GlcNAc qui est ensuite transformée en ManNAc par la GNE (*N-acétylglucosamine-2-épipimérase*). Le ManNAc naturel et ses dérivés synthétiques (ManNAI et ManNAz) sont des précurseurs métaboliques de la biosynthèse *de novo* du Neu5Ac et de ses dérivés dans le cytosol. Le ManNAc naturel (et ses dérivés) est d'abord également phosphorylé en position 6 par la GNE pour former du ManNAc-6P qui est ensuite transformé en Neu5Ac-9P par la NANS (*N-Acetylneuraminic acid synthase*), avant d'être dé-phosphorylé par la NANP (*N-Acetylneuraminic acid phosphatase*) pour former du Neu5Ac. Le Neu5Ac néo-synthétisé est libre et cytosolique, il est alors transféré dans le noyau où il est activé sous forme de CMP-Neu5Ac par la CMAS (*Cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid synthetase*). Une quantité importante du CMP-Neu5Ac est convertie en CMP-Neu5Gc par la CMAH (*Cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid monooxygenase*) chez de nombreuses espèces animales mais pas chez l'homme qui n'a pas de CMAH fonctionnelle ([Irie, Koyama et al. 1998](#)). Les CMP-Sia sont transportés dans la lumière du trans-Golgi où ils sont utilisés par l'une des nombreuses sialyl-transférases pour produire des liaisons de types α 2-3 (ST3), α 2-6 (ST6) et α 2-8 (ST8). Enfin, la cellule utilise les neuraminidases Neu1 (lysosome), Neu2 (cytoplasme), Neu3 (membrane plasmique), Neu4 (mitochondrie/lysosome), pour libérer l'acide sialique et le réactiver pour le recycler dans de nouvelles structures glycaniques ([Monti, Preti et al. 2002](#); [Monti, Bonten et al. 2010](#)). Il existe deux CMAS (CMP Sialic Acid Synthétase) chez le poisson zèbre ([Schaper, Bentrop et al. 2012](#)) exprimées différemment dans l'organisme contrairement aux mammifères où une seule CMAS a été reportée.

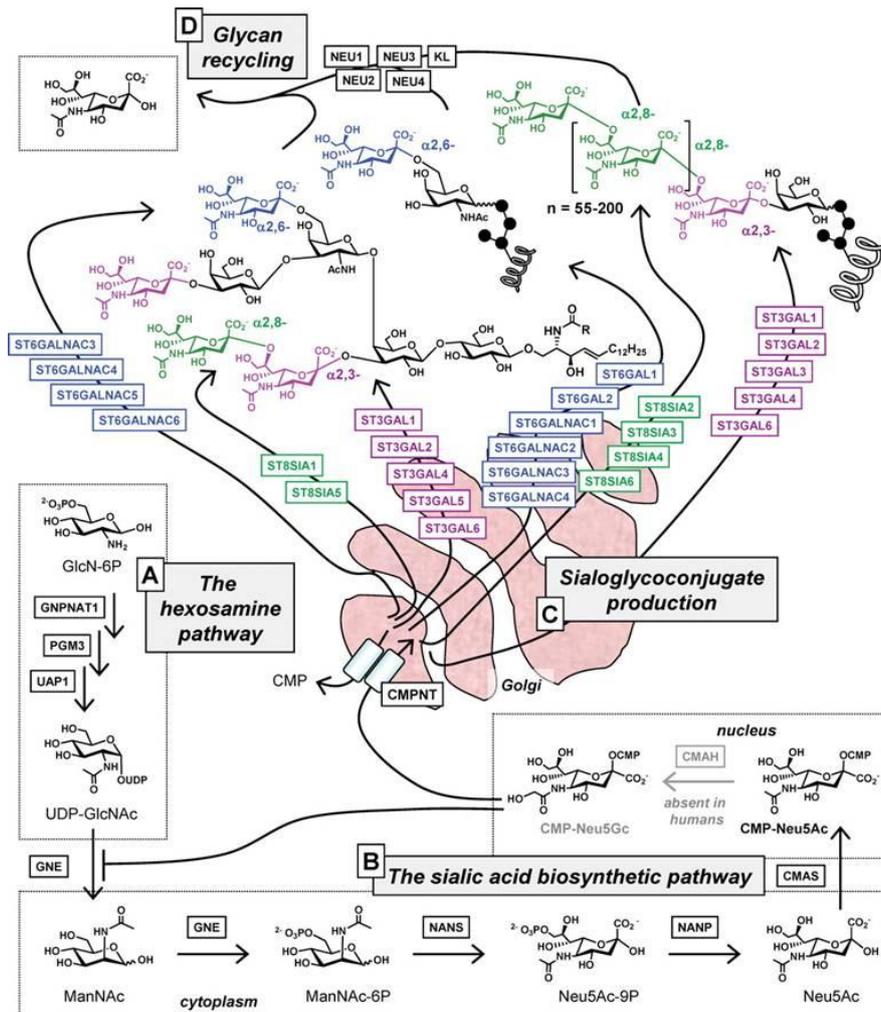


Figure 68 : Voie de Biosynthèse de l'acide sialique chez les mammifères, Tiré de (Du, Meledeo et al. 2009)

Les voies de biosynthèse de l'acide sialique et son transfert Golgien sur les principaux glycoconjugés grâce aux différentes sialyl-transférases (ST) sont décrites en détails. (A et B) Les transformations des monosaccharides et leur localisation sont illustrées dans les rectangles. (C) Les STs transfèrent le CMP-NeuAc ou CMP-NeuGc sur les glycoconjugés, elles ont un code couleur en fonction des liaisons qu'elles créent : (Rose = $\alpha 2,3$) ; (Vert = $\alpha 2,6$) ; (Bleu = $\alpha 2,8$). (D) Les Neuraminidases (Neu1-4 et KL) permettent de libérer les acides sialiques des glycoconjugés pour les recycler.

En plus de la biosynthèse *de novo* de l'acide sialique, un mécanisme d'incorporation de l'acide sialique d'origine exogène a récemment été mis en évidence (Tangvoranuntakul, Gagneux et al. 2003; Luchansky, Goon et al. 2004; Bardor, Nguyen et al. 2005). Les molécules hydrophiles chargées ne peuvent pas diffuser librement à travers la membrane plasmique et nécessitent l'action d'un transport actif pour passer dans le cytoplasme. Les voies d'entrées de l'acide sialique dans les cellules eucaryotes sont encore incertaines et nécessitent une analyse approfondie des différentes hypothèses (Bardor, Nguyen et al. 2005) (cf. Figure 69). Les quantifications de l'incorporation du Neu5Gc exogène dans des cellules caco-2 humaines et l'utilisation d'inhibiteurs du trafic vésiculaire ont permis d'impliquer les voies de l'endocytose indépendante de la clathrine et de la pinocytose en phase fluide. Ces mêmes résultats ont également permis d'infirmer le rôle de l'endocytose de vésicules à clathrines pour l'incorporation du Neu5Gc dans les cellules caco-2. L'acide sialique exogène est alors

internalisé dans les endosomes précoces et serait ensuite envoyé dans les lysosomes où les Sialines (transporteur d'acide sialique) permettraient son transfert dans le cytoplasme. Un transporteur inconnu de la membrane plasmique pourrait également permettre le transfert de l'acide sialique exogène ou de son précurseur dans le cytoplasme des cellules. Nous ne savons pas si les précurseurs métaboliques des acides sialiques peuvent également utiliser des transporteurs lysosomaux pour atteindre le cytoplasme. Plusieurs mécanismes peuvent également agir de concert sur ces molécules et nous ne savons pas précisément quel transport est utilisé pour l'incorporation de l'acide sialique et de ses précurseurs.

Cependant, Les analyses que nous avons faites sur les cellules ZFL et MCF-7 montrent bien l'incorporation du ManNAI, du SiaNAI et du Neu5Gc non-acétylés d'origines exogènes dans ces cellules. De plus, ces résultats montrent également que la GlcNAc et la GalNAc non-acétylés ne peuvent pas s'incorporer dans les cellules MCF-7 et qu'il y aurait donc un récepteur ou un transporteur capable de faire la différence entre la ManNAI, la GlcNAI et la GalNAI. L'utilisation des analogues de synthèse modifiés sur leurs groupes amines montrent bien que cette partie de la molécule ne semble pas impliquée dans le processus de reconnaissance et d'incorporation intracellulaire. Enfin, l'ensemble de ces résultats sont en accord avec les études menées sur l'incorporation de Neu5Gc d'origine alimentaire (viande rouge et laitage) par les cellules intestinales humaines ([Tangvoranuntakul, Gagneux et al. 2003](#)). Ce phénomène induirait la production d'anticorps circulants dirigés contre le Neu5Gc, et donc un processus inflammatoire cancérogène.

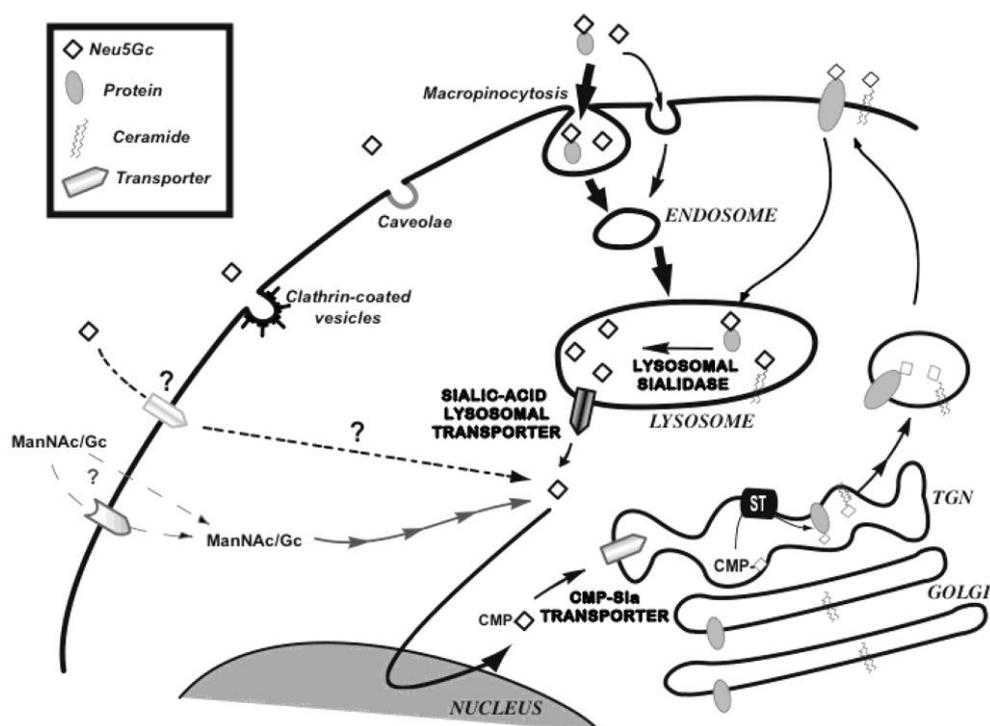


Figure 69 : Mécanismes supposés d'incorporation de l'acide sialique et de ses précurseurs dans les cellules eucaryotes. Tiré de ([Bardor, Nguyen et al. 2005](#))

Chapitre 2 : Les applications de la *click-chemistry*

C.2.1 Introduction :

Nous avons précédemment synthétisé un panel complet de sucres-alcynés pour le traçage métabolique des monosaccharides. Nous avons focalisé notre attention sur l'acide sialique et nous avons cherché des modèles cellulaires pertinents pour l'étude de la régulation de la sialylation. Nous avons décidé de travailler en collaboration interne avec l'équipe du Dr François Foulquier sur un modèle de fibroblastes primaires de patients CDG (*congénital disorder of glycosylation*) afin de visualiser l'impact des CDG sur la glycosylation golgienne et de découvrir les mécanismes d'entrée cellulaire de l'acide sialique exogène. Ces résultats mettent en avant un possible diagnostic des maladies CDG par des tests d'incorporation cellulaire de l'acide sialique et sont réalisables sur une quantité relativement faible des fibroblastes de patient. Nous avons également entrepris une collaboration internationale avec l'équipe du Pr Ralph Schwarz de l'université de Marbourg en Allemagne sur les interactions et la régulation de l'acide sialique entre la cellule HFF (*Human Foreskin Fibroblast*) et le parasite *Toxoplasma Gondii*. Ces deux études mettent en évidence les perturbations de la régulation de la sialylation au cours d'événements physiopathologiques particuliers.

C.2.2 Traçage de l'acide sialique dans les Patients CDG :

La visualisation des défauts de glycosylation du Golgi dans les cellules des patients atteints de troubles congénitaux de la glycosylation (CDG) est un véritable défi. La principale technique utilisée à grande échelle est celle de L'iso-électro-focalisation (IEF) et du *Western Blot* (WB) de la transferrine, qui permet de dépister les CDG les plus graves mais ne permet pas d'apprécier la nature du défaut ou d'établir avec certitude le diagnostic ([Goreta, Dabelic et al. 2012](#)). La spectrométrie de masse (MS) est utilisée en complément pour visualiser les défauts de la glycosylation des *N*-glycannes. La MS est une technique très sensible qui nécessite néanmoins une quantité importante de cellules et un certain temps d'analyse pour extraire et identifier les formes mineures d'un type de glycosylation. Les analyses MS focalisent souvent leur attention sur un seul type de glycanne, souvent les *N*-glycannes. Notre objectif est de développer une technique directe de visualisation des CDG basée sur le traçage de l'acide sialique alcyne (SiaNAI) par *click-chemistry*. Nous avons réalisé un ensemble d'expériences sur des fibroblastes en cultures primaires d'un large panel de patients CDG et sur des fibroblastes en cultures primaires de patients sains. Ces expériences nous permettent d'apprécier directement les défauts de glycosylation et sont réalisables sans le soutien d'une plateforme de MS et d'analyses.

Les CDG sont des maladies graves qui sont relativement rares mais illustrent de manière dramatique le rôle fondamental de la glycosylation dans les mécanismes de la vie. Nous avons analysé différentes CDG-I impliquant les enzymes de glycosylation telles que PMM2 et ALG11. Nous avons également analysé différentes CDG-II impliquant les protéines de transport golgiennes (COG7 et COG5), les transporteurs golgiens (ATP6V0A2, TMEM165) et une CDG-IIx non caractérisée.

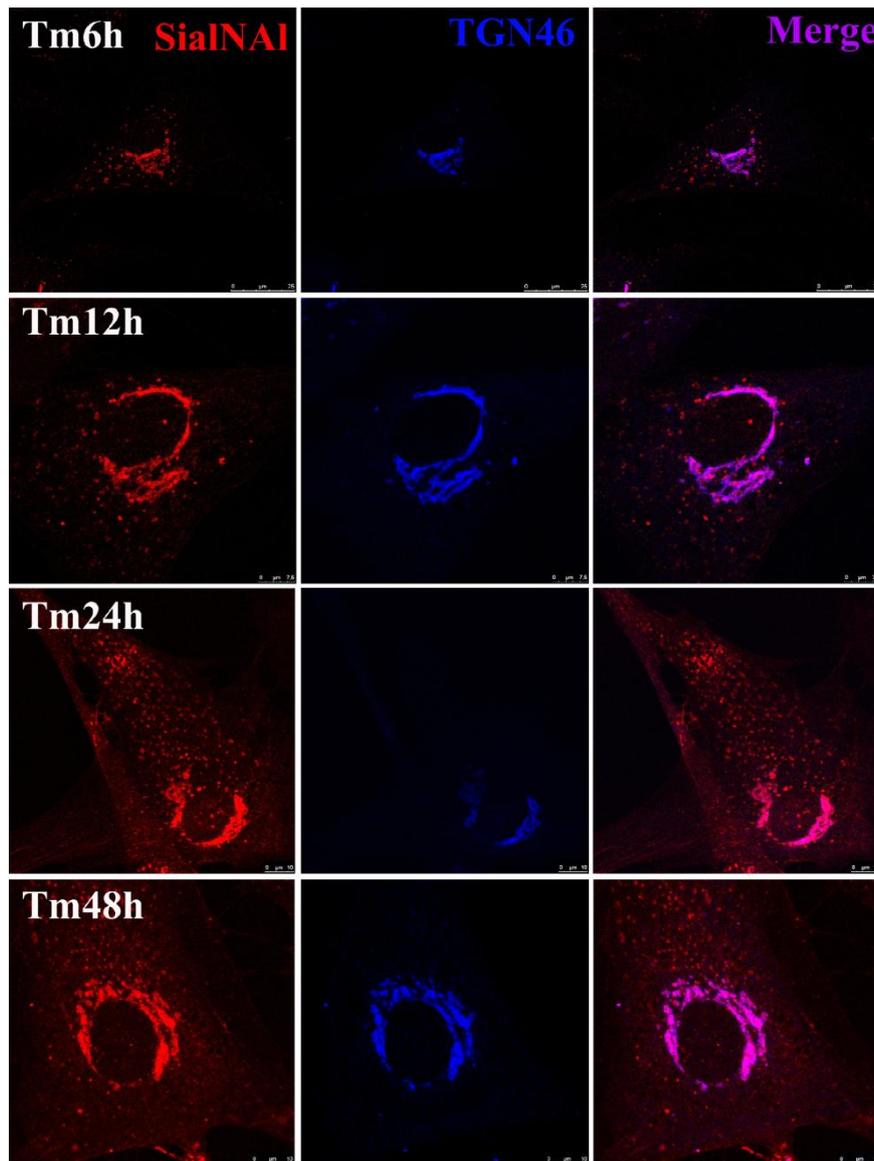


Figure 70 : Suivi cinétique de l'acide sialique (SiaNAI) dans des fibroblastes primaires d'un individu sain. Les fibroblastes ont été fixés après 6h, 12h, 24h et 48h d'incubation avec le SiaNAI par du para-formaldéhyde (PAF) à 4% dans du PBS. Le marquage du SiaNAI a été réalisé par click-chemistry avec l'azide-fluor-545 et le marquage du Trans-Golgi par immunofluorescence avec à l'anticorps TGN46.

Nous avons commencé par tester l'incorporation le SiaNAI dans les cellules de fibroblaste par une cinétique de 48h en utilisant un marquage à l'Azide-fluor-545 par *click-chemistry* et un marquage par immunofluorescence du Trans-Golgi par l'anticorps TGN46.

Nous avons confirmé l'incorporation du SiaNAI dans les fibroblastes par incubation dans le milieu de culture et visualiser dès 6 heures un marquage golgien et vésiculaire. Nous avons également pu observer une incorporation progressive du SiaNAI dans les fibroblastes avec une accumulation importante de SiaNAI dans le Trans-Golgi comme le montre la co-localisation avec l'anticorps TGN46. Le trafic vésiculaire plus intense et un marquage membranaire commence à apparaître des 24h d'incubation avec le SiaNAI. Nous avons choisi de travailler à 24h d'incubation sur les cellules des patients CDG puisque le marquage du SiaNAI est particulièrement intense tant au niveau golgien que vésiculaire.

Cette expérience préliminaire soulève plusieurs questions de recherches fondamentales très intéressantes sur l'incorporation de l'acide sialique exogène dans les cellules eucaryotes. Le mécanisme d'incorporation de l'acide sialique n'est pas encore clair, cependant la voie de la pinocytose en phase fluide reste la piste privilégiée. Nous avons observé dès 6h d'incubation la présence de marquages vésiculaires et golgiens, cependant nous ne savons pas si l'origine du marquage est vésiculaire puis golgienne ou l'inverse. Afin de connaître la nature des vésicules formées lors du marquage par le SiaNAI dans les fibroblastes de patient sain, nous avons utilisé des anticorps dirigés contre les vésicules endosomales précoces (Eea1) et contre les vésicules endosomales tardives et lysosomales (Lamp1).

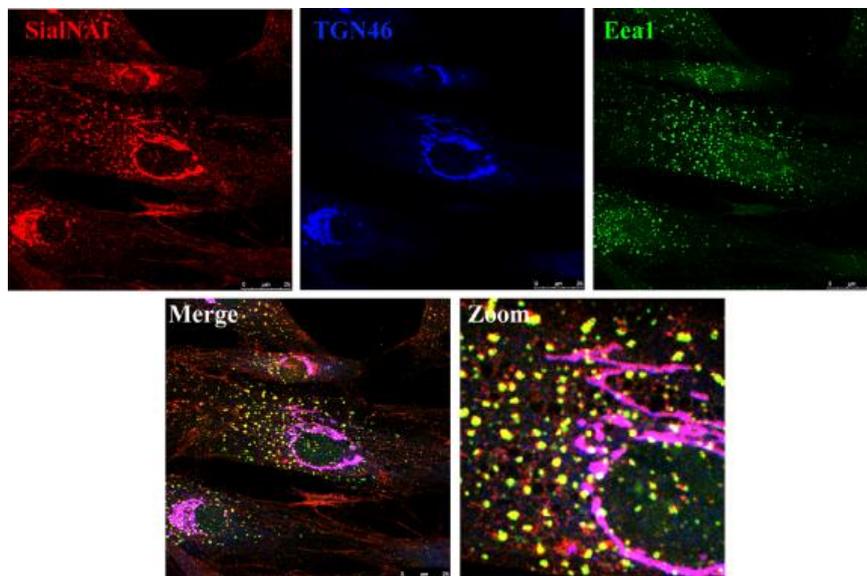


Figure 71 : Identification des vésicules produites lors du marquage du SiaNAI dans les fibroblastes contrôles. Les fibroblastes ont été fixés après 24h d'incubation avec le SiaNAI par du para-formaldéhyde (PAF) à 4% dans du PBS. Le marquage du SiaNAI a été réalisé par *click-chemistry* avec l'azide-fluor-545. Le marquage du Trans-Golgi par immunofluorescence avec l'anticorps TGN46 et le marquage des vésicules endosomales précoces par l'anticorps Eea1.

Le marquage de Eea1 nous a permis d'identifier précisément la nature des vésicules formées lors d'une incubation de 24h avec du SiaNAI dans des fibroblastes contrôles. En

effet, la parfaite co-localisation de Eea1 avec les vésicules marquées nous indique que celles-ci sont des endosomes précoces. Nous avons également réalisé un marquage avec l'anticorps Lamp1 pour savoir si le SiaNAI était présent dans les endosomes tardifs ou dans le lysosome et il s'avère que le SiaNAI n'est absolument pas présent dans ces compartiments. Son absence s'explique par la présence de transporteurs spécifiques de l'acide sialique qui transfèrent celui-ci de manière active depuis le lysosome vers le cytosol. Ces résultats sont en faveur d'une incorporation de l'acide sialique par pinocytose en phase fluide médiée par récepteur et l'utilisation d'un transport lysosomal. Nous savons que les vésicules d'endosomes précoces contiennent des quantités importantes de SiaNAI, mais nous ne savons pas si celui-ci est sous forme libre ou conjugué. En d'autres termes, nous ne savons pas si les vésicules d'endosomes précoces contiennent des acides sialiques libres fraîchement incorporés ou des glyco-conjugués membranaires à recycler.

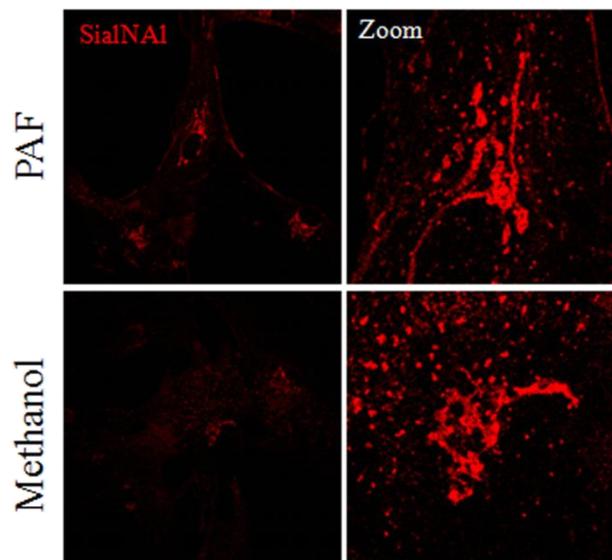


Figure 72 : Utilisation de 2 fixations différentes pour distinguer le SiaNAI libre et conjugué.

Les fibroblastes ont été fixés après 24h d'incubation avec le SiaNAI par du PAF à 4% dans du PBS à température ambiante ou par du méthanol froid à -20 °C. Le marquage du SiaNAI a été réalisé par *click-chemistry* avec l'azide-fluor-545.

Nous avons utilisé deux techniques de fixation différentes pour distinguer l'acide sialique libre de l'acide sialique conjugué. Le PAF à 4 % crée un réseau de pontages covalents entre les protéines et ne dénature pas les membranes lipidiques ce qui permet de mieux conserver les vésicules et les structures 3D des protéines, alors que le méthanol déstabilise les membranes et entraîne la fixation par déshydratation des protéines. Cette différence de fixation est importante lors du lavage des lamelles microscopiques au cours du marquage puisque, l'acide sialique libre sera éliminé beaucoup plus facilement si les membranes lipidiques des cellules sont altérées. Cependant, nous n'avons vu aucune différence de marquage vésiculaire et golgien après ces deux fixations. Il est assez difficile de conclure sur une absence de différence entre ces deux types de fixation, puisque l'acide sialique peut ne

pas avoir été éliminé après la fixation au méthanol ou être entièrement conjugué. Pour répondre définitivement à cette question il nous faudrait utiliser un mutant ou un inhibiteur spécifique des transporteurs lysosomaux de l'acide sialique afin de visualiser le marquage golgien. Si le Golgi n'est pas marqué, c'est que l'acide sialique est libre, bloqué et dégradé dans le lysosome et qu'il n'est plus capable d'entrer dans le cytoplasme puis dans le Golgi. Si le Golgi est marqué, c'est qu'il existe une autre voie d'incorporation de l'acide sialique et que celui-ci est fonctionnalisé et donc présent sous forme conjugué dans les vésicules.

Le SiaNAI doit impérativement être présent sous la forme libre dans le cytoplasme pour être fonctionnalisé dans le noyau en CMP-SiaNAI afin d'être utilisé dans le Golgi par les Sialyl-Transférases pour le lier aux glycoconjugués. La détection du SiaNAI dans le noyau ou le cytoplasme est un événement que nous n'avons pas observé puisque ces compartiments sont très vastes et que l'acide sialique ne semble pas s'y accumuler, bien que sa présence y soit plus que probable.

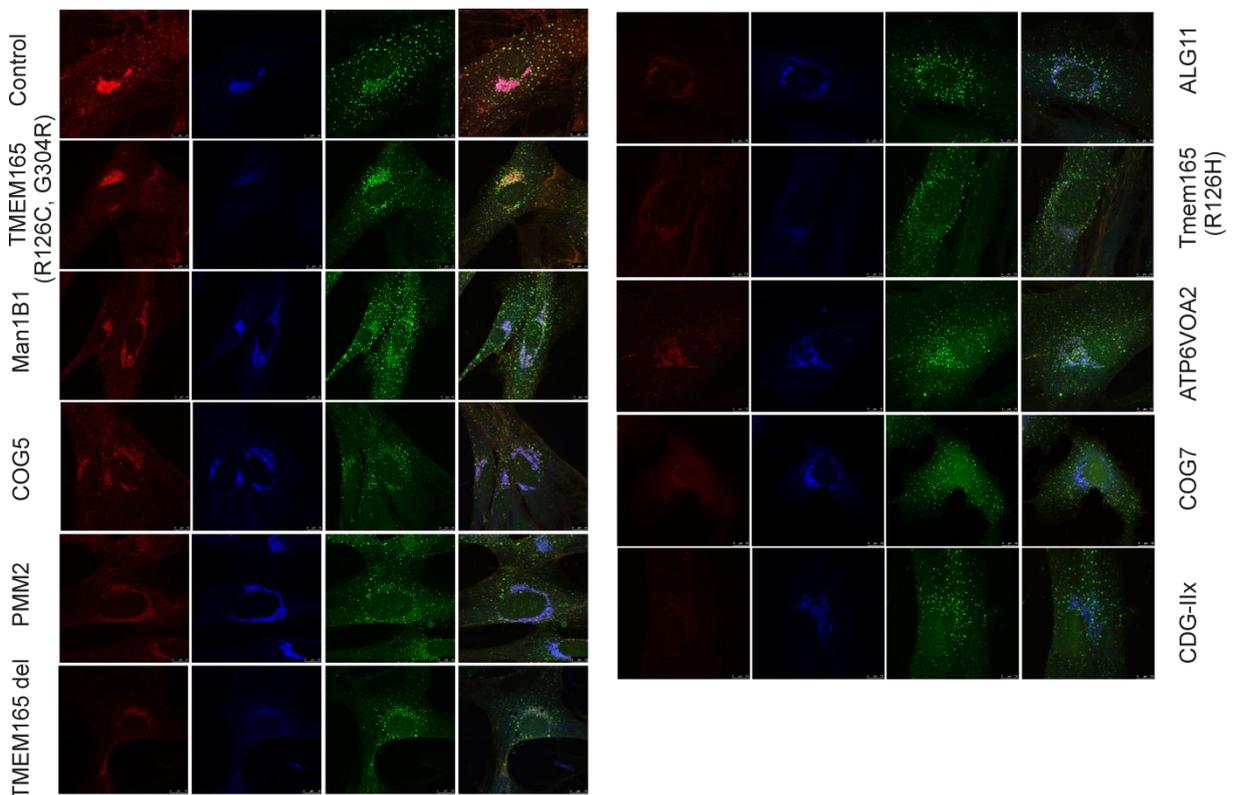


Figure 73 : Différence d'incorporation du SiaNAI dans les patients CDG-I et CDG-II.

Les fibroblastes contrôles et les fibroblastes issus de patients CDG-I et CDG-II ont été incubés avec 500 μ M de SiaNAI pendant 24h et fixés par du PAF à 4% dans du PBS. Le marquage du SiaNAI a été réalisé par *click-chemistry* avec l'azide-fluor-545 (rouge). Les anticorps primaires TMEM165 du Golgi (bleu) et Eea1 des endosomes précoces (vert) ont été révélés respectivement par les anticorps fluorescents secondaires de lapin Alexa-700 et Alexa-488.

Nous avons réalisé une expérience de marquage du SiaNAI sur des patients CDG-I et CDG-II et nous avons observé d'importantes différences d'intensités dans le marquage des patients CDG par rapport au contrôle. Les diminutions d'intensité les plus légères sont pour TMEM165 (R126C, G304R) et Man1B1, alors que les plus sévères sont pour CDG-IIx et COG7. Cette expérience nous montre de manière directe l'impact d'une CDG particulière sur la fonctionnalité du Golgi. Une corrélation directe entre le niveau d'incorporation et/ou de fonctionnalité du Golgi et la gravité des symptômes cliniques n'est pas évidente puisque chaque patient évolue différemment au sein d'une même CDG. Si nous comparons les CDG de COG5 et COG7, il apparaît que COG7 qui n'incorpore pas de SiaNAI dans son Golgi est associé à un risque létal infantile grave, alors que COG5 qui en incorpore à hauteur de 55 % par rapport au contrôle est associé à un risque létal infantile modéré. Pour savoir si la technique permet d'apprécier finement la gravité d'une CDG, il faudrait tester les fibroblastes d'un ensemble de patients présentant une même CDG et un suivi médical complet.

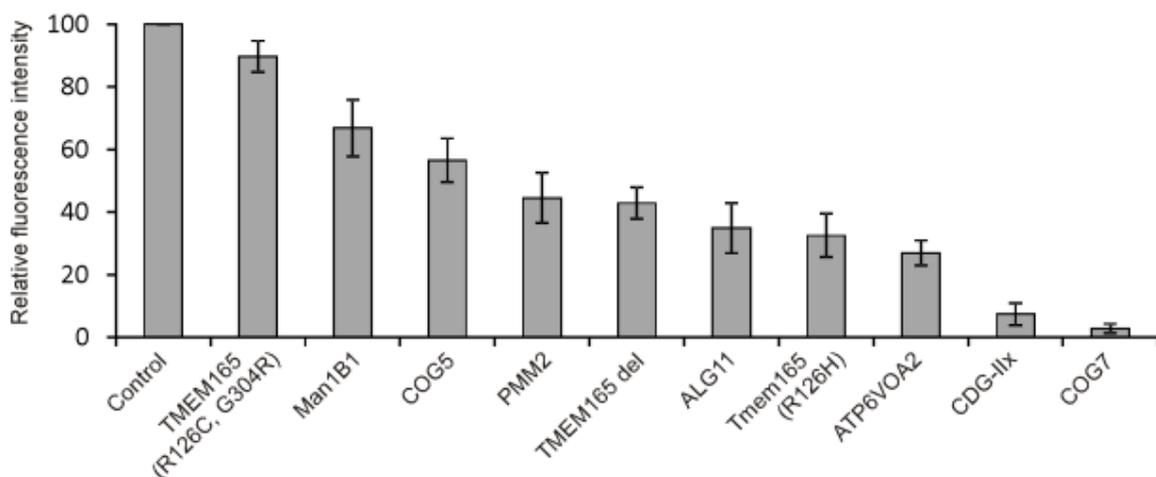


Figure 74 : Intensité de fluorescence golgienne du SiaNAI dans les fibroblastes contrôles et CDG.

Les intensités de fluorescence du SiaNAI golgien des fibroblastes contrôles et les fibroblastes issus de patients CDG-I et CDG-II de l'expérience précédente ont été mesurés en microscopie confocale. Nous avons utilisé un ensemble de 50 cellules pour effectuer nos mesures et établir des barres d'erreurs.

L'analyse des niveaux d'intensité de la fluorescence du SiaNAI dans les fibroblastes contrôles et CDG permet de classer précisément les niveaux d'incorporations et de fonctionnalités du Golgi les uns par rapport aux autres. Le classement par intensité décroissante est le suivant : Contrôle > TMEM165 (R126C, G304R) > Man1B1 > COG5 > PMM2 ou CDG-Ia > TMEM165 del > ALG11 > TMEM165 (R126H) > ATP6VOA2 > CDGIIx > COG7. Pour confirmer ces résultats, nous avons utilisé une méthode de quantification absolue de l'acide sialique par une dérivation au DMB qui reconnaît spécifiquement les acides alpha-cétoniques présent dans les acides sialiques.

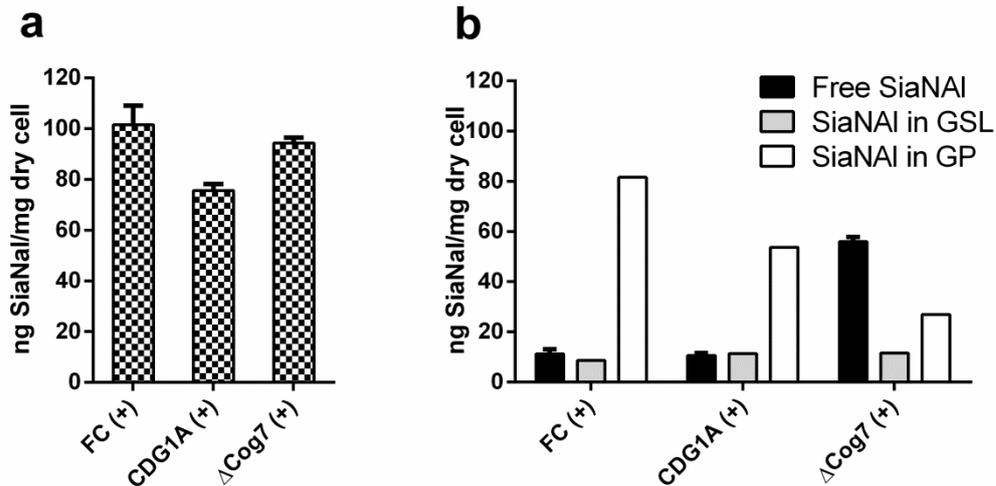


Figure 75 : Dosage de l'acide sialique dans les fibroblastes contrôles et CDG.

Quantification de l'incorporation du SiaNAI dans les fibroblastes contrôles et CDG (PMM2 ou CDG-Ia, et COG7) par dérivaison au DMB et mesure en HPLC à fluorescence après 72 heures d'incubation. (a) Quantification absolue du SiaNAI dans des cellules totales et (b) quantification absolue du SiaNAI sous forme libre et conjuguée aux glycosphingolipides (GSL) ou aux glycoprotéines (GP). Les valeurs et écart-types sont la moyenne de trois injections.

Nous avons incubé des fibroblastes contrôles et CDG (PMM2=CDG-Ia, et COG7) durant 72h avec 500 μ M de SiaNAI que nous avons récoltés et utilisés pour isoler trois fractions cellulaires spécifiques : le cytoplasme, les glycoprotéines (GP) et les glycosphingolipides (GSL). Puis nous avons réalisé, sur chacune de ces fractions, une hydrolyse douce pour libérer les acides sialiques et une dérivaison au DMB pour les rendre fluorescents. La quantité de SiaNAI (ng/mg de cellules sèches) a été déterminée par HPLC à fluorescence en utilisant une gamme étalon standard de SiaNAI. Le graphique (a) reflète directement la capacité d'incorporation des cellules testées et dévoile une déficience d'incorporation modérée pour COG7 (92%) et pour CDG-Ia (78%) par rapport au contrôle. Cependant, le graphique (b) illustre la répartition du SiaNAI sous formes libres et conjuguées aux GP ou aux GSL. La quantité de SiaNAI dans les GSL est stable dans les fibroblastes contrôles et les CDG, ce qui indique que leur sialylation n'est pas perturbée. En revanche, la sialylation des GP est perturbée dans les fibroblastes CDG-Ia et COG7 puisqu'ils présentent respectivement 33% et 66% de SiaNAI en moins dans leurs glycoprotéines par rapport aux fibroblastes contrôles. Ces résultats sur les GP sont en accord avec le classement des intensités de fluorescence mesurées en microscopie. Enfin, la quantité de SiaNAI libre présente dans les fibroblastes contrôles et CDG-Ia est identique alors que celle présente dans les fibroblastes COG7 est très importante et représente quatre fois la quantité présente dans les fibroblastes contrôles. Cette accumulation importante du SiaNAI sous la forme libre dans les fibroblastes COG7 témoigne d'un système fonctionnel d'incorporation d'acide sialique exogène et d'un important défaut golgien dans les mécanismes de sialylation des GP.

C.2.3 L'acide sialique dans le parasite *Toxoplasma gondii* :

Toxoplasma gondii est un parasite protozoaire intracellulaire obligatoire du phylum des *Apicomplexas* responsable de la toxoplasmose qui est une maladie bénigne asymptomatique chez les sujets immunocompétents. Cependant, de graves complications cérébrales peuvent survenir chez les sujets immunodéprimés ou chez les fœtus lors d'une primo-contamination de la mère. On estime que plus d'un tiers de la population mondiale est infecté à travers toutes les régions du monde ([Montoya and Liesenfeld 2004](#)). Les mammifères et les oiseaux sont les hôtes intermédiaires du parasite qui y réside sous forme inactive de bradyzoïte (kyste) dans les tissus musculaires et cérébraux lors d'une réponse immunitaire forte ou sous forme active tachyzoïtes lors de la primo-infection ou lors d'une réponse immunitaire faible. Les félinés sont les hôtes définitifs du parasite qui s'infectent en ingérant des tissus contaminés par des parasites sous forme bradyzoïtes. Les félinés infectés assurent la reproduction sexuée du parasite sous forme mérozoïte qui produit les gamétocytes. Après la fécondation, le parasite se trouve sous la forme de sporozoïtes (oocystes) qui sont disséminés dans l'environnement par les fèces des félins et peuvent alors infecter les hôtes intermédiaires par la contamination de leurs nourritures.

Le phylum des *Apicomplexas* rassemble des parasites d'incidences majeurs sur la santé de la population mondiale, à savoir : *Plasmodium*, *Toxoplasma Neospora*, *Sarcocystis*, *Cryptosporidium*, *Eimeria*. *Toxoplasma* est utilisé comme un des modèles majeurs d'étude de ces parasites et nous aide à comprendre les mécanismes qu'il utilise pour infecter les cellules et résister au système immunitaire ses hôtes intermédiaires et définitifs. Nous nous sommes intéressés particulièrement aux échanges glycaniques qui pourraient survenir lors du cycle lytique du tachyzoïte suite à sa multiplication asexuée.

Le *Toxoplasme* présente certains organites d'une cellule eucaryote : le Noyau, le Réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi et de nombreux ribosomes. Le *Toxoplasme* possède en outre des organites spécifiques comme les apicoplastes, les rhoptries, les micronèmes et les granules denses. Ces organites spécifiques permettent au *Toxoplasme* d'assurer sa propagation grâce au cycle lytique du Tachyzoïte qui se déroule en 5 phases distinctes : (1) l'invasion de la cellule hôte par le parasite, (2) la formation de la membrane parasitophore, (3) les échanges multiples du parasite et de la cellule hôte, (4) la multiplication parasitaire, (5) la libération du parasite par la lyse de la cellule hôte.

(1) La phase d'invasion des *Apicomplexas* commence dans le sérum sanguin où la faible concentration en potassium (K^+) active la phospholipase C (PLC) qui hydrolyse le PIP2 (Phosphatidyl-Isositol 4,5-diphosphate) en IP3 (Inositol 1,4,5-triphosphate) et DAG (DiAcyl-Glycérol). L'IP3 active son récepteur (IP3R) à la surface du réticulum endoplasmique qui libère du calcium (Ca^{2+}) dans le cytosol. Cette augmentation de la concentration calcique du cytosol permet d'activer la protéine kinase CDPK1 qui relâche les protéines des micronèmes dans l'espace extracellulaire et restaure le niveau basal du calcium cytosolique. Les protéines

des micronèmes vont créer une interaction forte avec les glycoprotéines sialylées ([Friedrich, Matthews et al. 2010](#)) de la cellule cible. Suite à ces interactions les rhoptries vont libérer leurs protéines grâce à un mécanisme inconnu. La sécrétion de protéines spécifiques permet au parasite de créer une interaction forte et une jonction mouvante (MJ) avec la cellule cible. Puis, le parasite entre dans la cellule cible entouré de la membrane plasmique de celle-ci.

(3) La membrane parasitophore va ensuite très rapidement se lier au réticulum endoplasmique, au Golgi et aux mitochondries afin d'acquérir les éléments indispensables à sa survie. En effet, le parasite est auxotrophe pour le tryptophane ([Flegr 2013](#)) et les bases puriques ([Chaudhary, Darling et al. 2004](#)) et nécessite un apport important en lipides ([Coppens 2006](#)) provenant des mitochondries et de la membrane pour assurer sa multiplication. La membrane parasitophore est donc un lieu d'échange important et de protection qui permet au parasite de tirer profit de son hôte. De plus, cette membrane permet de réguler les échanges ioniques (Na^+ , K^+ et Ca^{2+}) entre la cellule, la membrane parasitophore et le parasite ([Coppens and Joiner 2001](#)).

(4) La multiplication du parasite est un événement synchronisé qui s'opère par endodyogénie dans la vacuole parasitophore. Ce processus consiste à former deux cellules-filles dans une cellule-mère qui se désintègre et forme un résidu membranaire utile à la synchronisation ([Gubbels, White et al. 2008](#)). Cette reproduction suit la règle des 2^n parasites formés par cycle où « n » est le nombre de cycles qui oscille entre 3 et 4 par jour selon le type de cellule infectée. La multiplication ordonnée du parasite les positionne de manière à ce que chaque individu ait sa face apicale dirigée vers la membrane parasitophore ; ce phénomène abouti à la formation de structures en rosette des parasites.

(5) Enfin, le mécanisme d'évasion des parasites est un phénomène destructif qui conduit à la lyse de la cellule hôte et à la libération des parasites. Ces parasites vont pouvoir poursuivre leur cycle lytique en contaminant de nouvelles cellules ou s'enkyster si la réponse immunitaire de l'hôte intermédiaire est réactive.

Nous nous sommes intéressés à la glycosylation des GSL et aux échanges métaboliques du parasite avec la cellule hôte au cours de la phase aigüe de l'infection par les tachyzoïtes. La glycosylation des toxoplasmes tachyzoïtes est un sujet très controversé puisqu'il est difficile d'isoler les tachyzoïtes des membranes plasmiques de la cellule hôte et d'identifier spécifiquement les glycanes du parasite. Néanmoins, notre équipe a pu identifier spécifiquement les *N*-glycanes de *T. gondii* par comparaison des profils MS de plusieurs lignées cellulaires HFF, VERO et B3F7 infectées ou non par *T. gondii* ([Garenaux, Shams-Eldin et al. 2008](#)). Il résulte que *T. gondii* peut synthétiser ses propres *N*-glycanes de type $\text{Glc}_{0-3}\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ et incorporer des intermédiaires des DoIP des *N*-glycanes provenant de la cellule hôte. Ces résultats indiquent en outre que les *N*-glycanes du parasite sont entièrement dépourvus de fucose et d'acide sialique. Peu d'information existe sur l'utilisation des GSL de la cellule hôte par le toxoplasme tachyzoïte qui ne semble pas

capable d'en synthétiser. Une étude récente chez les shizonts de *Plasmodium falsiparum* a montré l'activité d'une GCS (Glucosyl-Céramide Synthéase) responsable de la formation de GlcCer composé d'une sphingosine saturée (d18:0 ou d20:0) et d'acide gras saturé court (C10-C14) et poly-hydroxylé ([Couto, Caffaro et al. 2004](#)). La présence de GlcCer est de plus indispensable au le développement de *Plasmodium falsiparum* ([Pankova-Kholmyansky, Dagan et al. 2003](#)).

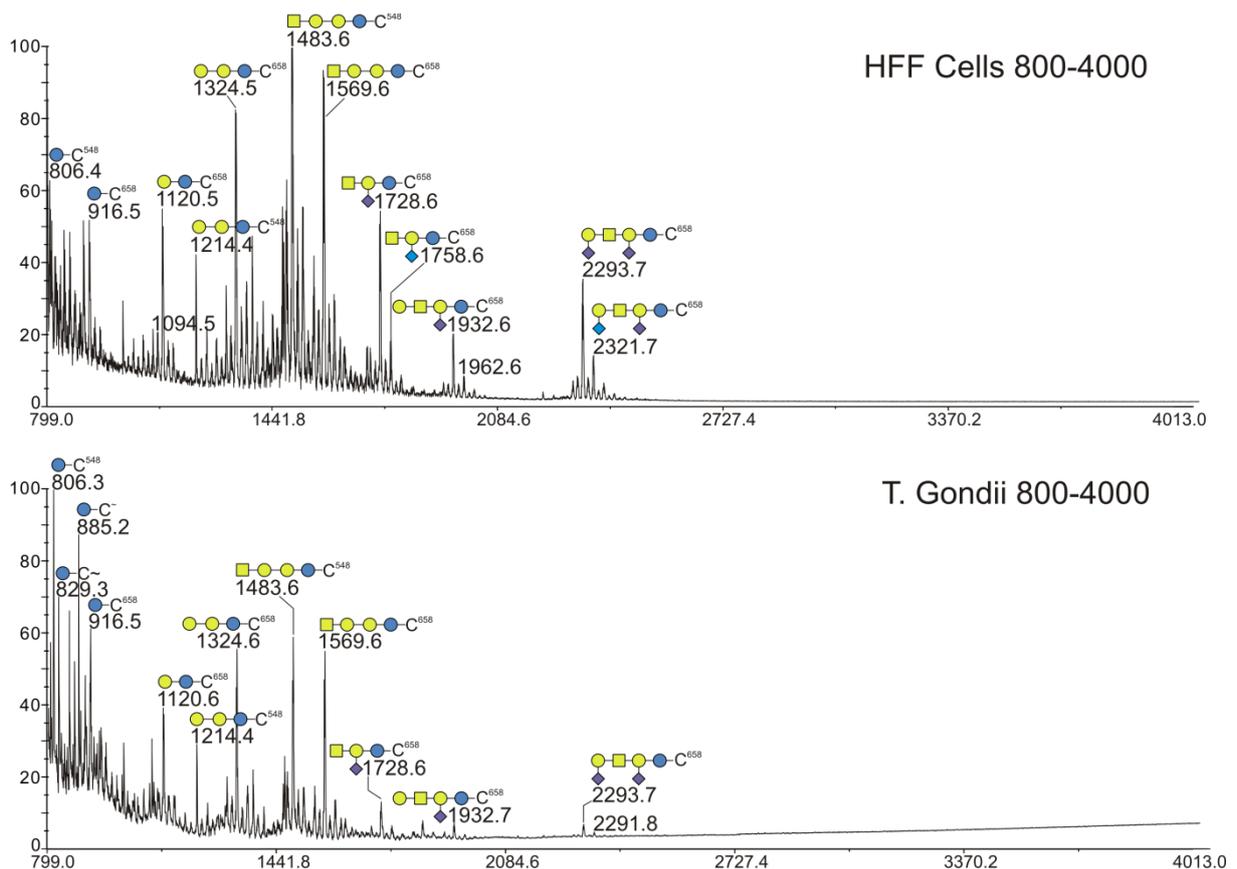


Figure 76 : Comparaison des GSL des fibroblastes HFF et de *T. Gondii* tachyzoïtes.

Les profils des glycosphingolipides perméthylés des fibroblastes HFF et de *T. Gondii* tachyzoïte ont été analysé par MALDI-TOF MS pour être comparé sur une gamme de masse de 800 à 4000 m/z.

L'analyse des GSL perméthylés de fibroblastes HFF et de *T. Gondii* tachyzoïte a montré une grande similitude sur un plan qualitatif et quantitatif. Cette ressemblance flagrante est certainement due à une assimilation des GSL de la cellule hôte par le parasite tachyzoïte, puisque celui-ci est incapable de synthétiser des GSL complexes. Cependant le doute persiste sur l'origine des GSL qui pourraient également provenir d'une contamination par les GSL de la cellule hôte lors de l'isolement du parasite. Pour élucider l'origine de ces GSL, nous avons utilisé le marquage métabolique des sialoconjugués par le SiaNAI, dans le but d'observer un transfert de l'acide sialique des cellules hôtes vers les parasites.

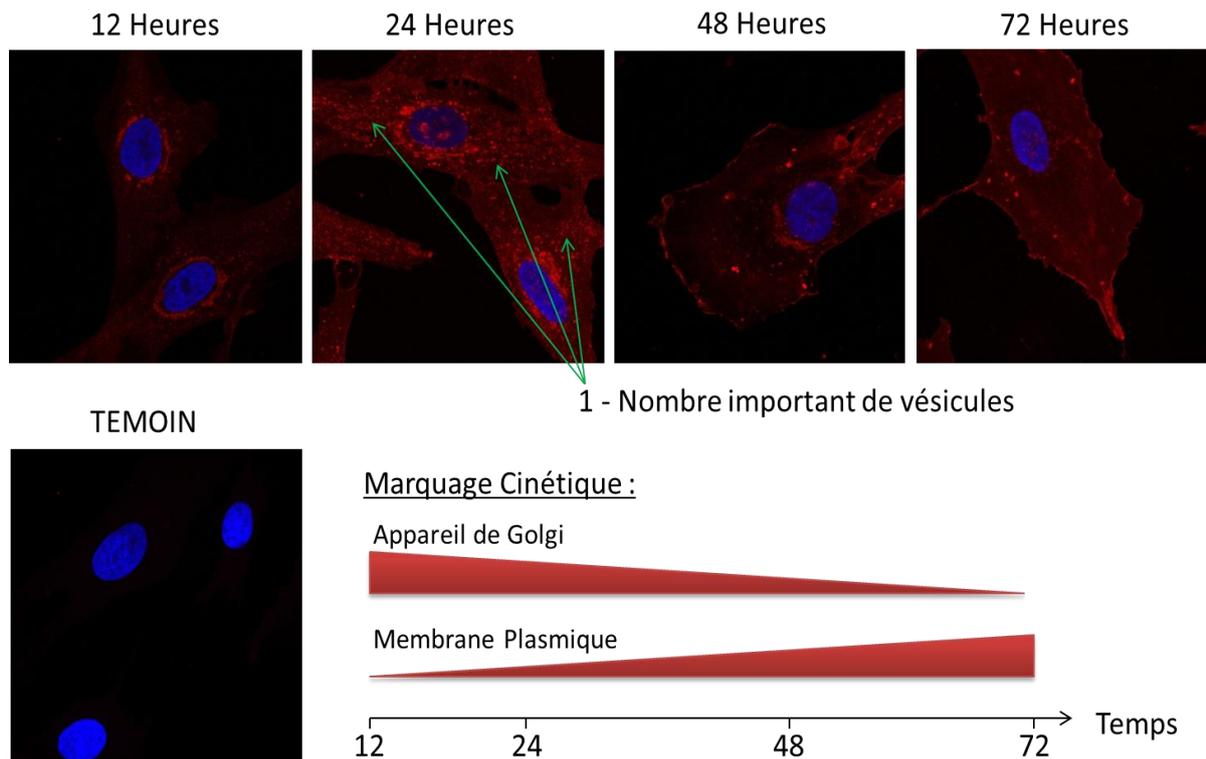


Figure 77 : Suivi cinétique de l'acide sialique (SiaNAI) dans des cellules HFF.

Les fibroblastes ont été fixés après 12h, 24h, 48h et 72h d'incubation avec le SiaNAI par du para-formaldéhyde (PAF) à 4% dans du PBS. Le marquage du SiaNAI a été réalisé par *click-chemistry* avec l'azide-fluor-545 et le marquage des noyaux a été réalisé par du DAPI.

Nous avons réalisé un test cinétique pour étudier l'incorporation du SiaNAI dans les fibroblastes HFF et optimiser les conditions de marquage des parasites *T. gondii* tachyzoïtes. Nous observons une cinétique d'incorporation rapide du SiaNAI qui se traduit par une forte métabolisation dans le Golgi dès 12h, puis par un transport actif des glycoconjugués marqués vers la membrane plasmique dès 24h incluant un nombre important de vésicules marquées, et enfin une localisation principalement membranaires des glycoconjugués marqués entre 48 et 72h. Nous avons décidé de tester l'incorporation de SiaNAI dans *T. gondii* en utilisant 48 heures de marquage pour laisser le temps aux GSL acides d'incorporer suffisamment de SiaNAI pour marquer les parasites tachyzoïtes en cas d'incorporation puisque nous savons, grâce aux expériences précédentes, que le SiaNAI s'incorpore faiblement dans les GSL.

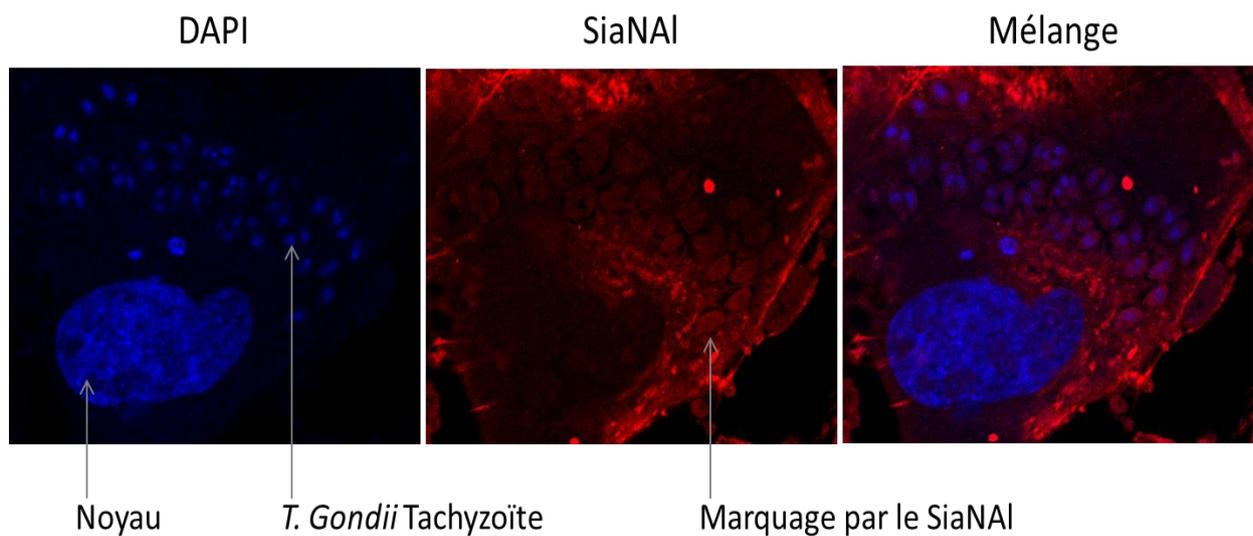


Figure 78 : Suivi cinétique de l'acide sialique (SiaNAI) dans des cellules HFF infecté par *T. gondii*. Les fibroblastes ont été fixés après 48h d'incubation avec le SiaNAI et 48h d'infection par le *T. gondii* Tachyzoïte par du para-formaldéhyde (PAF) à 4% dans du PBS. Le marquage du SiaNAI a été réalisé par *click-chemistry* avec l'azide-fluor-545 et le marquage des noyaux a été réalisé par du DAPI.

L'analyse préliminaire du suivi de l'incorporation des GSL par le parasite après 48h d'incubation et 48h d'infection a montré un léger marquage des parasites au sein de la cellule hôte par rapport au témoin négatif qui ne répond pas du tout en fluorescence. Ces résultats sont en faveur d'un transfert de GSL acides de la cellule hôte vers le parasite qui ne synthétise pas de GSL complexes et qui n'utilise pas l'acide sialique dans ses oligosaccharides, car il ne possède aucune sialyltransférase. Une communication scientifique récente sur *Plasmodium falciparum* illustre l'incorporation directe de GM1 fluorescent exogène par les érythrocytes ainsi que son transfert et son accumulation dans la phase intra-érythrocytaire du parasite ([Essaka, White et al. 2010](#)). Ce transfert particulier pourrait servir de stratégie mimétique au parasite pour éviter d'être reconnu par le système immunitaire et demande à être étudié. Aussi, nous devrions poursuivre ces analyses en faisant varier les durées d'incubations et les durées d'infections pour visualiser toutes les étapes du cycle lytique du tachyzoïte, afin d'optimiser les conditions de marquage et de définir précisément l'étape du cycle lytique durant laquelle le parasite va absorber les GSL de la cellule hôte.

Chapitre 3 : Evolution de la sialylation des *N*-glycannes sériques au cours de l'infection par *Trypanosoma cruzi* chez la souris.

C.3.1 Introduction :

Le genre *Trypanosoma* représente des organismes unicellulaires eucaryotes de parasites protistes composés d'une vingtaine d'espèces connus capables d'infecter de nombreux vertébrés par l'intermédiaire de plusieurs vecteurs d'invertébrés hématophages comme les insectes ou la sangsues ([Chimelli and Scaravilli 1997](#)). Les espèces de *Trypanosoma* infectant l'homme sont *Trypanosoma cruzi* (maladie de Chagas) et *Trypanosoma ganbiense* (maladie du sommeil). Ces deux maladies sont létales et sont très différentes bien qu'elles soient provoquées par le même genre : *Trypanosoma*. Elles ont des zones endémiques différentes, des hôtes intermédiaires différents, des cycles de vie différents et provoquent des symptômes différents. Cette différenciation importante des espèces de *Trypanosoma* pathogènes ou non s'explique par des millions d'années évolutions et à leurs larges spectres hôtes intermédiaires et finaux ([Stevens and Rambaut 2001](#)). Nous allons nous intéresser particulièrement à *Trypanosoma cruzi* dans la suite de cet exposé.

La maladie de Chagas est endémique d'Amérique du sud et d'Amérique centrale, elle est transmise par les fèces infectées par *Trypanosoma cruzi* des Réduces (punaises) qui entrent facilement en contact avec les plaies provoquées par les piqûres de ces insectes ([Machado, Jelicks et al. 2012](#)). La maladie se décompose en deux phases : une phase aiguë courte (plusieurs semaines) accompagnée de symptômes mineurs et une phase chronique (10 à 20 ans). Les problèmes associés à cette pathologie sont nombreux et touchent les organes internes (cœur, œsophage, colon et système nerveux périphérique). Le caractère léthal de la maladie est principalement dû aux risques d'insuffisance cardiaque ou à un infarctus ischémique ([Machado, Jelicks et al. 2012](#)).

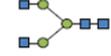
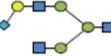
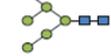
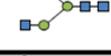
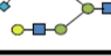
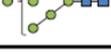
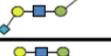
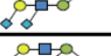
Nous avons voulu identifier les variations de l'expression des *N*-glycannes sériques de souris lors de la phase aiguë de l'infection de *Trypanosoma cruzi* afin d'identifier un biomarqueur glycanique spécifique. La détection *Trypanosoma cruzi* lors de la phase aiguë est encore actuellement difficile puisque bien souvent asymptomatique et nécessite souvent l'utilisation de prélèvements sanguins et une analyse immunologique ou de biologie moléculaire ([Gilber, Alban et al. 2013](#)). Néanmoins, l'analyse cinétique du protéome sérique durant l'infection devrait permettre d'identifier la présence de protéines sériques nouvelles d'origine humaine ou parasitaire spécifique de la phase aiguë de l'infection de *Trypanosoma cruzi*.

C.3.2 Objectifs :

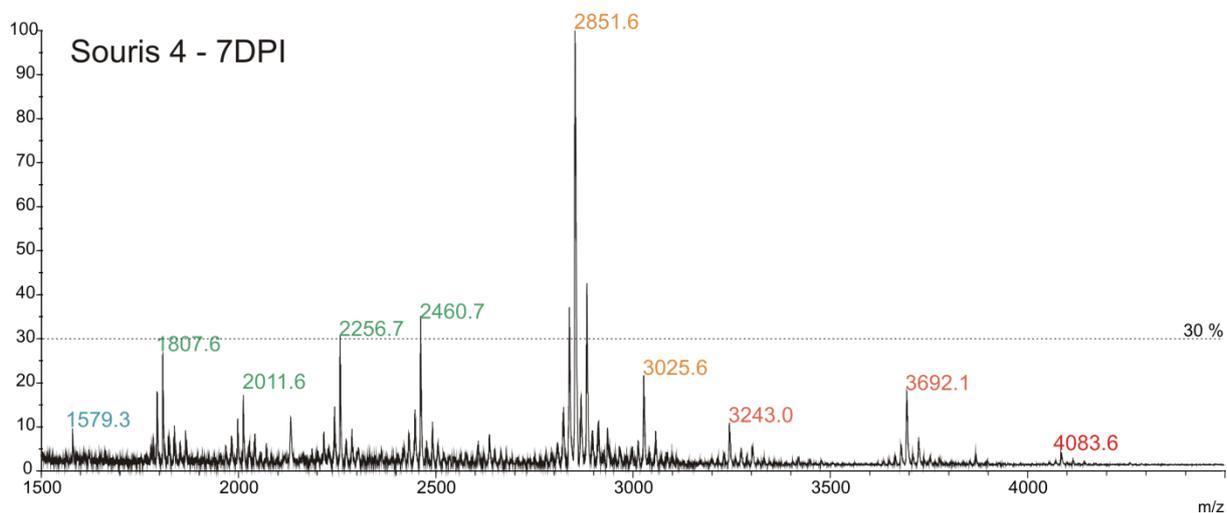
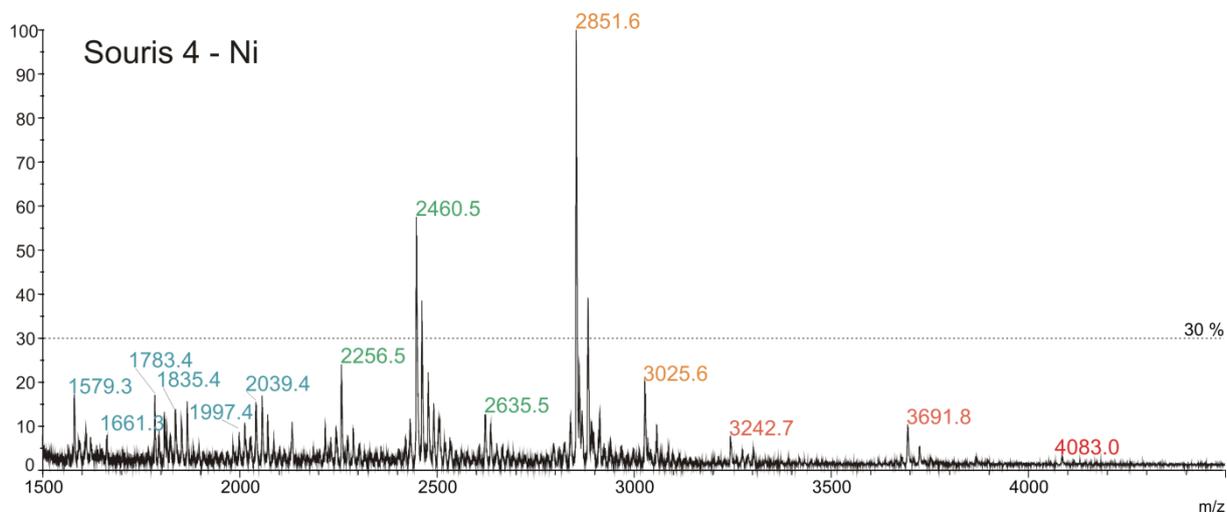
Nous avons étudié 12 souris Balb/C (WT) âgés de 7 semaines sur lesquelles nous avons réalisé une inoculation de *Trypanosoma cruzi* et des prélèvements sanguins rétrobulbaires sur des périodes données : NI (Non Infectée), 7DPI (7 Days Post-Infection), 14DPI (14 Days Post-Infection, 21DPI (21 Days Post-Infection) et 28DPI (28 Days Post-Infection). La courbe de viabilité des souris lors de cette expérience est la suivante : NI (12 individus) > 7DPI (12 individus) > 14DPI (12 individus) > 21DPI (10 individus) > 28DPI (1 individu). Nous n'avons pas inclu les résultats obtenus sur l'unique souris 28DPI dans notre étude, pour des raisons statistiques. Nous avons récupéré 200 µL de sérum pour chaque prélèvement sur lequel nous avons fait des analyses structurales des Ng par MS ; ainsi que des analyses de quantification des acides sialiques et des protéines. Nous avons observé les changements de la glycosylation des protéines sériques au cours de la phase aiguë de l'infection par le parasite *Trypanosoma cruzi*.

C.3.3 Résultats :

Tableau 10 : Résumé des structures majoritaires des N-glycannes sériques de la souris Balb/C.

N-glycannes Neutres de souris SCID			N-glycannes Acides de souris SCID			
AS*	Masse	Structure	AS*	Masse	Structure	
0	1579		1	1807		
	1661			2256		
	1783			2430		
	1835			2460		
	1865			2635		
	1987			2	2851	
	2039				3025	
	2069			3	3242	
	2243				3692	
			4	4083		

Le Tableau 10 résume l'ensemble des structures de Ng identifiés par des analyses MS et MS/MS présentes dans le sérum des souris Balb/C durant l'infection par *T.cruzi*. Un code de cinq couleurs distingue les niveaux d'acidité de ces structures : bleu (0 unité d'acide sialique), vert (1 unité d'acide sialique), orange (2 unités d'acide sialique), rose (3 unités d'acide sialique) et rouge (4 unités d'acide sialique).



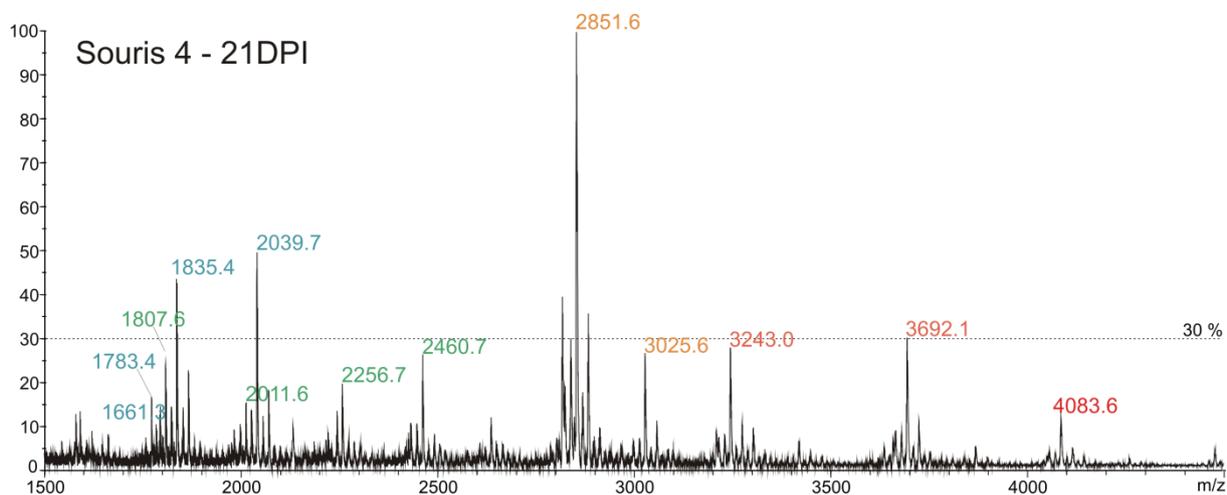
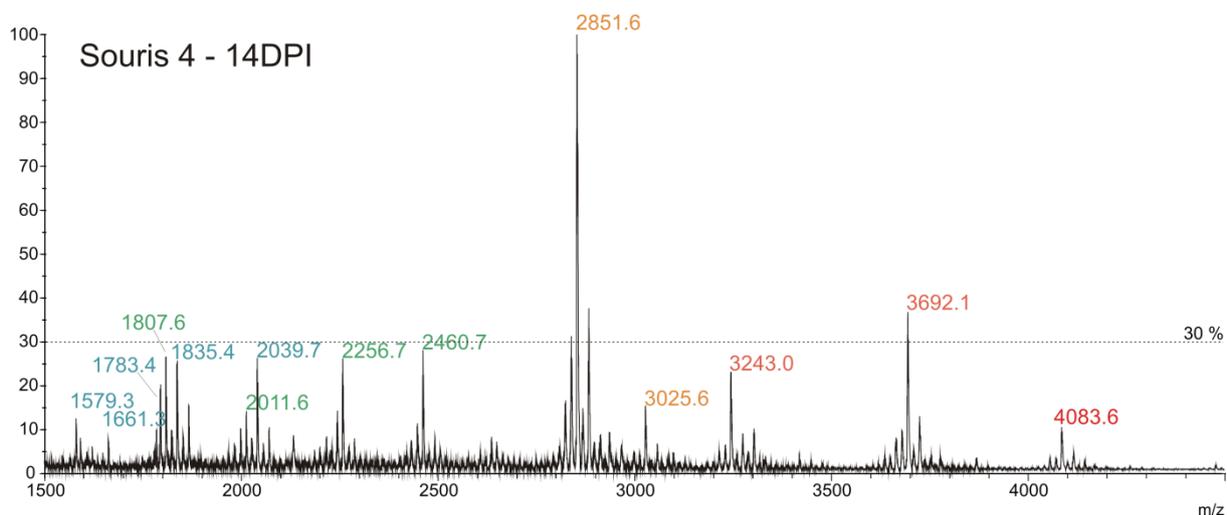


Figure 79 : Spectre MALDI-TOF des *N*-glycannes sériques de souris durant l'infection par *Trypanosoma cruzi*.

Les Ng sériques perméthylés d'une même souris ont été analysés avant et après l'infection par *T. cruzi*, représentant 4 conditions : NI (non infectée), 7DPI (*Day Post Infection*), 14DPI et 21DPI. Un code couleur représentant les glycannes du tableau 6 ont été utilisées pour indiquer les niveaux de sialylations des *N*-glycannes. Bleu (0 unité d'acide sialique), Vert (1 unité d'acide sialique), Orange (2 unités d'acide sialique) Rose (3 unités d'acide sialique) et Rouge (4 unités d'acide sialique).

Les profils MS des *N*-glycannes sériques de la souris 4 (*cf.* figure 79) et de l'ensemble des souris testées montrent une évolution progressive de la distribution des structures de *N*-glycannes au cours de l'infection par *T. cruzi* vers des structures acides et notamment des structures « lourdes » composées de trois à quatre unités de Neu5Gc. Cette augmentation des structures acides est particulièrement intense au cours des 14DPI où le signal à *m/z* 3692 (Ng tri-antennés/tri-sialylés) dépasse les 30% d'intensité. Cependant, à partir des 21DPI ce phénomène diminue légèrement. L'infection par *T. cruzi* dans sa phase aigüe chez la souris ne change pas de manière qualitative la distribution des *N*-glycannes sériques qui est conservée durant les 21DPI

Afin de pouvoir comparer directement les intensités des spectres MS de *N*-glycannes sériques de souris, nous avons utilisé précisément les mêmes volumes de sérum (100 μ L) que nous avons prélevés durant les mêmes créneaux horaires. Les analyses ont été effectuées de manière simultanées et les échantillons perméthylés ont été déposés sur la plaque MALDI-TOF en utilisant les mêmes volumes. Ainsi, nous avons apprécié les différences d'intensité des *N*-glycannes des souris NI, 7DPI, 14DPI et 21DPI. Ces résultats suggèrent clairement une évolution des structures acides au cours de l'infection avec un maximum au niveau des 14DPI. Néanmoins, la spectrométrie de masse en mode MALDI n'étant pas quantitative dans les conditions utilisées, nous avons directement quantifié par HPLC les acides sialiques associés aux Ng.

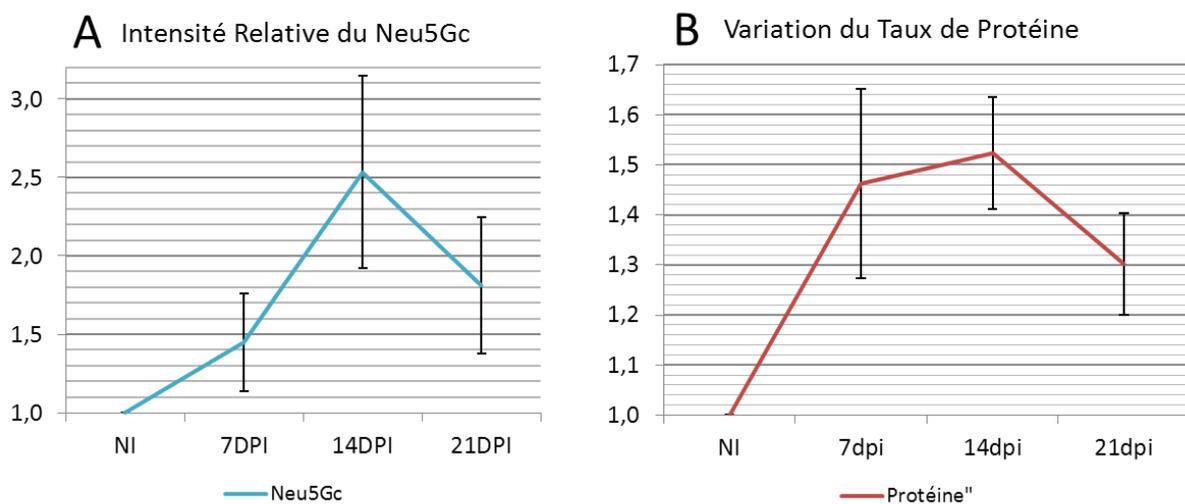


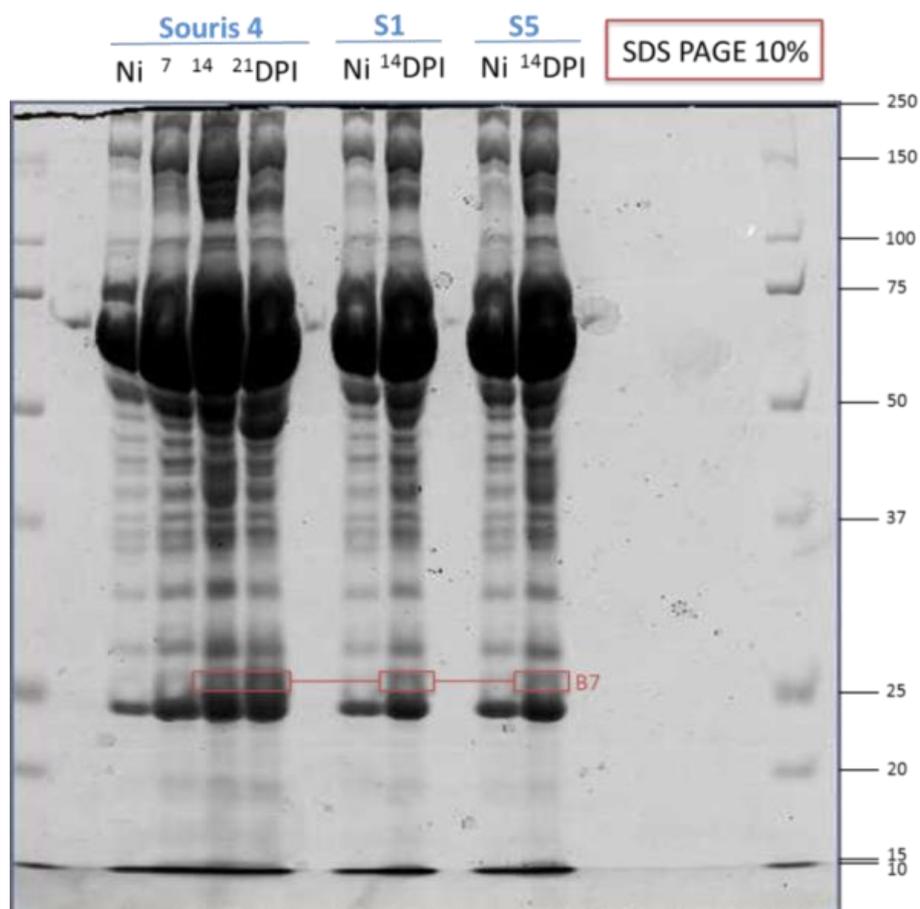
Figure 80 : Quantification relative du Neu5Gc et des protéines sériques chez la souris Balb/C.

Le dosage de l'acide sialique (A) et du taux de protéine (B) a été réalisé chez 12 souris avant et après infection par *T. cruzi*, représentant 4 conditions : Ni (non infectée), 7DPI (*Day Post Infection*), 14DPI et 21DPI. Les acides sialiques ont été dosés après dérivation au DMB et quantification par HPLC à fluorescence et les protéines ont été quantifiées par un dosage colorimétrique à la BCA.

Les résultats des dosages du Neu5Gc et du taux de protéines sériques chez les souris avant et après infection par *T. cruzi* montrent une forte régulation de la sialylation des protéines. Au 7^e jour après l'infection par *T. cruzi*, nous observons une augmentation conjointe du taux d'acide sialique et de protéines d'environ 1,5 fois par rapport aux souris non-infectées. Au 14^e jour après l'infection par *T. cruzi*, nous constatons une progression du taux d'acide sialique à environ 2,5 fois le niveau des souris non-infectées ; alors que le taux des protéines sériques se stabilise à environ 1,6 fois le niveau des souris non-infectées. Au 21^e jour après l'infection par *T. cruzi*, nous visualisons une diminution conjointe du taux d'acide sialique et des protéines sériques à respectivement 1,7 et 1,3 fois le niveau des souris non-infectées. Ces données illustrent une augmentation significative de la sialylation

des protéines qui ne peut pas être précisément chiffrée en raison de la grande variabilité du taux initial de protéines sériques présent chez un individu. Ce phénomène impacte directement la quantification de l'acide sialique réalisée à partir de 20 µL de sérum, ce qui explique la présence d'écart-types importants. Néanmoins, la variation de la quantité totale d'acide sialique associée aux Ng est en accord avec celle du taux de sialylation des espèces sialylées des Ng.

L'activité des sialidases (SA) et des trans-sialidases (TS) a été particulièrement bien étudiée chez *T. cruzi* et a été détectée dans le sérum et le sang de souris durant la phase aigüe de l'infection ([Alcantara-Neves and Pontes-de-Carvalho 1995](#)). Ces activités enzymatiques permettent aux parasites d'échapper au système immunitaire de son hôte et de faire « diversion » avec celui-ci qui s'attaquera aux cellules hôtes qui ont perdu leurs acides sialiques. Chez des souris immunocompétentes, cette activité s'arrête lors de la réponse immunitaire qui dirige des anticorps contre ces enzymes. Nous avons donc cherché à connaître la nature des protéines sialylées qui sont ciblées lors de ce processus de remodelage de la sialylation des protéines sériques lors de la phase aigüe de l'infection par *T. cruzi*.



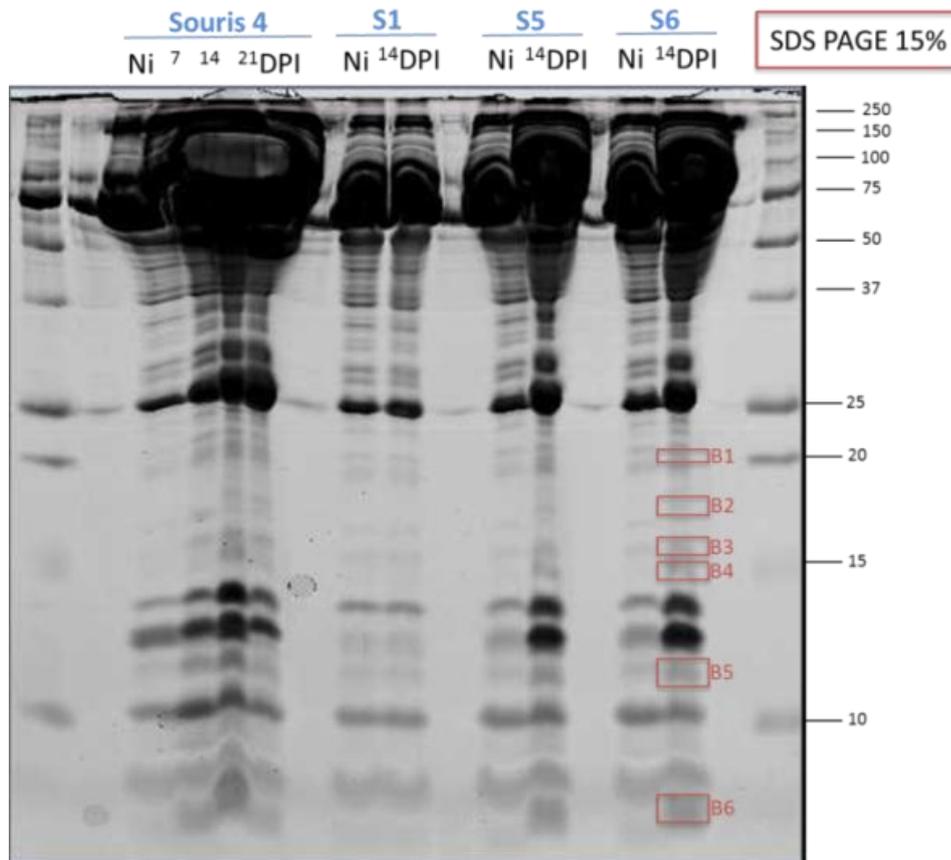


Figure 81 : SDS-Page 1D à 10% et 15% des protéines sériques de souris Balb/c infectées ou non par *T. cruzi*
 SDS-PAGE à 10% et 15 % sur les protéines sériques de souris 1, 4 et 5 infectées ou non par *T. cruzi* dans les conditions suivantes : Ni (non infectée), 7DPI (*Day Post Infection*), 14DPI et 21DPI. Les protéines ont été révélées par du bleu de coomacie. Les témoins de masses disposés de chaque coté du gel son exprimé en kDa.

Nous avons visualisé les changements d'expression du protéome sérique lors de la phase aiguë de l'infection par *T. cruzi* en réalisant des expériences de SDS-PAGE à 10% et 15% révélé au bleu de Coomassie avec le sérum des souris issues conditions suivantes : Ni (non infectée), 7DPI, 14DPI et 21DPI. Nous avons observé peu de changements qualitatifs des protéines lors de la phase aiguë de l'infection par *T. cruzi* à l'exception de quelques protéines inexistantes avant l'infection et apparues après l'infection, que nous avons relevées sur le gel en B1 à B7. Nous avons également constaté l'augmentation générale du taux de protéines lors de l'infection et annoté quelques protéines par rapport à leur masse : la sérum albumine (67 kDa), les chaînes lourdes (50 kDa) et légères des IgG (25 kDa).

Ces travaux très préliminaires devront être accompagnés d'une étude plus approfondie de protéomique pour visualiser en électrophorèse à deux dimensions, les changements du protéome sérique des souris lors de l'infection du parasite *T. cruzi*. De plus, nous devrions réaliser des expériences d'empreintes peptidiques pour identifier les protéines dont l'expression est impactée lors de la phase aiguë de l'infection du parasite.

Chapitre 3 : Conclusions.

L'acide sialique est un élément important de l'organisation des structures glycaniques des cellules eucaryotes que nous avons pu visualiser par microscopie et quantifier par HPLC dans plusieurs contextes biologiques d'intérêts.

Nous avons pu visualiser directement les défauts de glycosylation golgien dans le cas des maladies congénitales de la glycosylation grâce à des expériences d'incorporation d'un analogue alcyné de l'acide sialique que nous avons synthétisé, le SiaNAI. Ces analyses ont permis d'établir une nouvelle méthode diagnostic pour visualiser les défauts golgiens de la glycosylation des patients CDG, grâce à un marquage rapide au SiaNAI sur une quantité réduite de fibroblastes primaires humains. Ces résultats montrent également la co-localisation parfaite du SiaNAI (après 24h d'incubation) avec l'anticorps Eea-1 dans les fibroblastes primaires issus d'individus sains, ce qui indique que le SiaNAI serait incorporé par la voie endosomale. Des tests récents montrent une co-localisation du SiaNAI avec l'anticorps lamp2 qui marque les endosomes tardifs et le lysosome, ce qui semble indiquer que le SiaNAI est bien incorporé *via* le récepteur des sialines présent au niveau du lysosome.

Nous avons également pu mettre en évidence, lors des expériences préliminaires sur les fibroblastes HFF infectés par les parasites tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii*, qu'il y aurait probablement un échange de sialoconjugués marqués par le SiaNAI entre la cellule et le parasite. Nous avons aussi observé les changements marquants dans les quantités d'acides sialiques et de protéines sériques durant l'infection par le parasite *Trypanosoma cruzii* chez la souris durant les 21 jours après l'infection. Ces changements ont aussi été observés lors des analyses pas MS des profils de Ng qui montrent bien une évolution de la sialylation de ces oligosaccharides notamment à 14 jours après l'infection.

Enfin, nous avons analysé en parallèle de ces travaux les modifications du profil de glycosylation des GSL lors de la surexpression de la GD3 synthétase dans les cellules MCF-7 et observé un changement total dans la distribution des gangliosides et prouvé que cette enzyme est capable d'oligomériser l'acide sialique sur les gangliosides de type GD3. Nous avons inclus ces résultats sous forme d'un article dans la partie annexe.

Ensemble, ces résultats montrent un rôle très important de l'acide sialique au niveau de différents processus pathologiques et métaboliques. La poursuite de ces études nous permettra de connaître les mécanismes d'incorporation de l'acide sialique exogène et de cribler les défauts de glycosylation de patient et de mutant par microscopie afin de sonder les diverses voies métaboliques. L'étude des interactions entre la cellule hôte et le parasite apporte de précieuses informations sur les échanges des sialoglycoconjugués et permet de visualiser les processus de mimétisme de parasite dans des environnements biologiques complexes. Cette stratégie de marquage pourrait permettre à terme d'isoler les

sialoglycoconjugués incorporés par le parasite pour caractériser ces glycoconjugués et comprendre la glyco-stratégie du parasite. Enfin, l'analyse de l'évolution des structures glycaniques couplée à des analyses protéomiques classiques permet de comprendre les phénomènes physiopathologiques impliqués lors de la phase aiguë de la maladie de Chagas, afin de trouver des marqueurs pertinents de dépistage précoce en rapport avec l'activité de la trans-sialidase du parasite.

Conclusion Générale et Discussion

Conclusion Générale et Discussion

La première partie de nos travaux concerne l'étude de la glycobiochimie structurale et métabolique à travers plusieurs modèles d'études à l'échelle des cellules et organes du poisson zèbre. En particulier, nous nous sommes focalisés sur l'établissement de la carte de glycosylation complète des glycosphingolipides et des *N*- et *O*-glycannes des cellules ZFL et des organes du poisson zèbre adulte par des techniques spectroscopiques. Ces travaux permettent d'améliorer nos connaissances générales de la glycobiochimie aquatique et nous permettent d'appréhender les différences de distribution structurales des glycannes dans les organes du poisson zèbre. Ces connaissances permettront d'explorer les fonctions liées à la spécificité des structures glycaniques vis-à-vis de chaque organe grâce aux techniques de biologie moléculaire déjà bien établies sur ce modèle biologique. Pour ce faire, nos connaissances structurales accumulées sur les glycoconjugués des organes du poisson zèbre devront être approfondies par une caractérisation plus fine des structures nouvelles des séries lacto-ganglio et des extensions de la série ganglio, afin d'identifier les enzymes impliquées dans la biosynthèse de ces structures. La connaissance des voies de biosynthèses de ces structures permettra de les inactiver ou de les sur-activer pour visualiser leurs impacts sur le développement du poisson zèbre et au niveau des organes où ces structures sont les plus exprimées.

D'autre part, la comparaison directe des profils MS des *N*- et *O*-glycannes des organes du poisson zèbre adulte avec les profils MS décrits dans les organes humains et murins montrent des divergences très importantes. Les Ng humains et murins ont des structures de complexes composées de tri- et tetra-antennées que nous avons peu observées dans les Ng du ZF adulte, qui présentent une majorité de Ng bi-antennées constituées d'une structure spécifique du « zebrafish epitope » qui n'est pas présente dans le modèle humain et murin. Des différences importantes sont également présentes entre les Og du ZF et ceux du modèle humain et murin qui divergent de par la nature de certaines structures et la répartition des structures dans les organes. La comparaison des GSL entre ces espèces est particulièrement difficile, puisque les données structurales sous forme de profils MS de chaque organe humain et murin sont particulièrement rares. Ces différences s'expliquent facilement par la distance génétique qui sépare ces espèces, mais apporte des informations intéressantes sur l'évolution de l'organisation des structures glycaniques au sein des vertébrés. Il faudra par exemple poursuivre l'analyse structurale sur le *Medaka* pour étendre nos connaissances sur cette autre modèle de vertébré afin de savoir si nos observations structurales sont spécifiques du poisson zèbre ou si elles reflètent l'organisation structurale des glycannes des Actinoptérygiens. Néanmoins, nos données structurales sur les glycoconjugués du ZF permettent de faire évoluer ce modèle vers une plateforme d'analyse fonctionnelle de la glycobiochimie. En effet, ces connaissances structurales permettront de sonder plus

facilement les fonctions des structures glycaniques vis-à-vis d'un organe et permettront aux chercheurs de connaître l'environnement glycanique dans lequel ils travaillent.

La seconde partie de mes travaux met l'accent sur les synthèses organiques réalisées pendant mon doctorat et décrit les mécanismes mis en jeu lors de ces expériences. Les produits synthétisés permettent de réaliser le traçage métabolique des glycanes majeurs présents chez les eucaryotes et permettent également d'envisager la purification des glycoconjugués ayant incorporé les monosaccharides modifiés par l'usage d'une sonde-azide appropriée. En effet, cette stratégie permettrait de connaître les glycoconjugués synthétisés lors d'évènements physiopathologiques particuliers. Le fait de pouvoir isoler des glycoconjugués spécifiques d'un type de glycanes sur un laps de temps donné permet de caractériser une réponse cellulaire, suite à l'utilisation d'une drogue ou d'un événement particulier. Ces outils sont donc également très intéressants pour réaliser des études fonctionnelles de la régulation des glycoconjugués. Nous pourrions alors utiliser les sucres-alcynés pour réaliser des tests fonctionnels sur la régulation des glycoconjugués dans des modèles cellulaires pertinents ou sur modèle du poisson zèbre.

Une autre piste particulièrement intéressante se situe niveau du développement technologique de ces outils chimiques d'études de la glycosylation. Nous avons constaté dans la bibliographie que les analogues alcynés de la thymidine peuvent facilement être visualisés par microscopie Raman et ont notamment pu être imagés au niveau du noyau des cellules Hela ([Yamakoshi, Dodo et al. 2011](#); [Yamakoshi, Dodo et al. 2012](#); [Palonpon, Ando et al. 2013](#)). Nous avons commencé à tester la possibilité d'utiliser la microscopie Raman sur les cellules Hela pour visualiser un sucre alcyné, le ManNAI. Pour ce faire, nous avons utilisé un spectromètre Raman dans le domaine visible grâce à un laser rouge à 633 nm au centre LASIR (Laboratoire de Spectrochimie Infrarouge et Raman) de l'université Lille1 avec le soutien du Dr Myriam Moreau. Les premiers résultats obtenus sont très similaires aux résultats obtenus par l'équipe du Dr Yamahoshi et montrent la possibilité d'imager le ManNAI dans les cellules Hela en culture dans du milieu UltraMEM par la microscopie Raman. En fait, le spectre Raman du milieu UltraMEM ne montre aucun pic caractéristique à part le pic de l'eau aux alentours de 2800 à 3500 cm^{-1} . Les cellules Hela présentent le profil caractéristique avec des signaux Raman $< 2000 \text{ cm}^{-1}$ qui correspondent aux liaisons carbonées (simples et doubles), et le pic caractéristique de l'eau aux alentours de 2800 à 3500 cm^{-1} . Les cellules Hela ont une zone dite silencieuse entre les valeurs 2000 et 2800 cm^{-1} particulièrement intéressante pour observer le signal caractéristique de la fonction alcyne du ManNAI qui répond à 2123 cm^{-1} (cf. Figure 82). Il est de ce fait possible de distinguer directement la molécule de ManNAI à l'intérieur des cellules Hela *in vivo* sans utiliser de sonde pour les localiser. Cette nouvelle stratégie de marquage directe est intéressante et devra s'accompagner d'une méthodologie et d'une instrumentalisation adéquate pour avoir la meilleure sensibilité possible.

Cellules + ManNAI en Laser Rouge (633 nm)

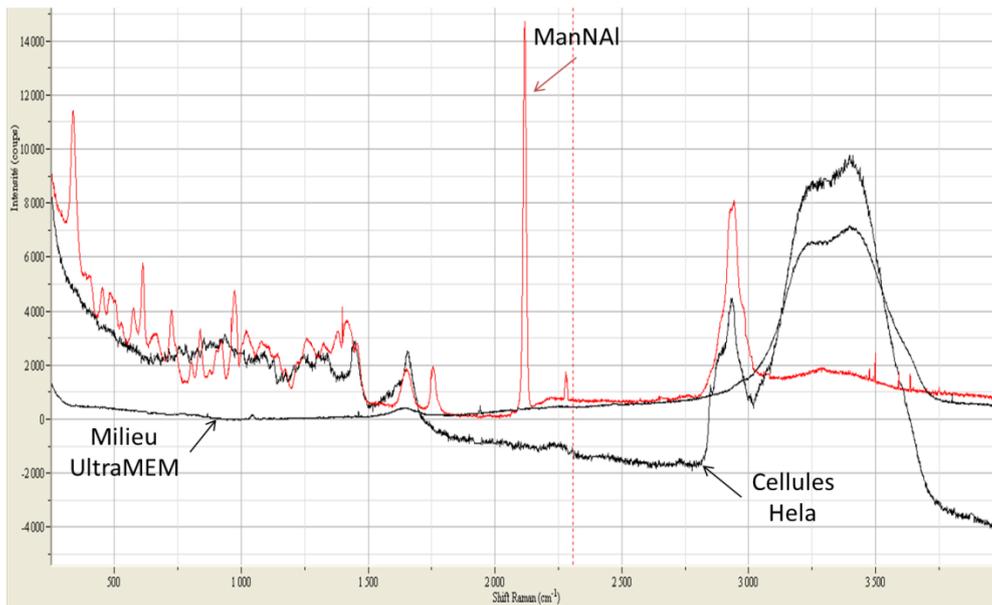


Figure 82 : Spectres Raman superposés des cellules Hela, du milieu UltraMEM et du ManNAI.

La troisième partie de mes travaux se focalise sur le traçage de l'acide sialique dans les cellules eucaryotes par click-chemistry dans le contexte des maladies congénitales de la glycosylation ou lors d'une infection par le parasite *Toxoplasma gondii*. Cette partie met également l'accent sur l'évolution des glycoprotéines dans le cas d'une infection par *Trypanosoma cruzii* ou sur l'évolution des glycosphingolipides lors de la surexpression de la GD3 synthase (cf. Annexes)

Nous avons utilisé une approche métabolique pour visualiser les défauts de la glycosylation dans des fibroblastes primaires issus de patients CDG. Nous voulons poursuivre ces travaux en analysant les effets de l'inhibition transitoire des glyco-enzymes impliquées dans les processus de glycosylation dans un système à haut débit afin de visualiser leur impact sur la glycosylation golgienne. Nous voulons également poursuivre nos investigations sur le mode d'incorporation de l'acide sialique et de son précurseur par microscopie, soit en utilisant des inhibiteurs de voies endosomales, soit en utilisant des cellules déficientes dans le transporteur lysosomale de l'acide sialique. Enfin, nous essayerons de déterminer quel mécanisme d'incorporation cellulaire permet de discriminer le ManNAI par rapport au GlcNAI et à la GalNAI.

Les tests d'incorporation des sialoconjugués dans la forme Tachyzoïte du parasite *T. gondii* devront être poursuivis pour connaître la nature précise des échanges entre le parasite et la cellule hôte. Pour ce faire, nous devons optimiser le marquage du SiaNAI dans les parasites en adaptant les temps de pré-incubation des cellules au SiaNAI et les temps d'infection du parasite. Une fois que ces paramètres seront optimisés, nous pourrons envisager de purifier les glycoconjugués marqués pour les caractériser.

La dernière partie de mon travail a consistée à analyser la régulation sérique de la sialylation au cours de la phase aiguë de la maladie de Chagas dans les souris. Lors de ces analyses nous avons constaté une augmentation importante du niveau de sialylation et du taux de protéines au 14^e jour après l'infection. Nous devons poursuivre cette analyse en réalisant des électrophorèses à deux dimensions que nous pourrons ensuite révéler grâce à des lectines pour visualiser uniquement les variations d'expression des sialo-glycoprotéines. Nous devons également identifier toutes les protéines dont les niveaux d'expression varient significativement, afin de détecter de potentiels marqueurs précoces pour le diagnostic de la maladie de Chagas.

Annexes

Annexes

Molecules **2012**, *17*, 9559-9572; doi:10.3390/molecules17089559

OPEN ACCESS

molecules

ISSN 1420-3049

www.mdpi.com/journal/molecules

Article

Accumulation of Unusual Gangliosides G_{Q3} and G_{P3} in Breast Cancer Cells Expressing the G_{D3} Synthase

Agata Steenackers ^{1,†}, Jorick Vanbeselaere ^{1,†}, Aurélie Cazet ^{1,‡}, Marie Bobowski ¹, Yoann Rombouts ^{1,#}, Florent Colomb ¹, Xuefen Le Bourhis ², Yann Guérardel ¹ and Philippe Delannoy ^{1,*}

¹ Structural and Functional Glycobiology Unit, UMR CNRS 8576, University of Sciences and Technologies of Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq, France; E-Mails: agata.steenackers@hotmail.fr (A.S.); jorick.vanbeselaere@gmail.com (J.V.); aurelie_cazet@yahoo.fr (A.C.); marie.bobowski@hotmail.fr (M.B.); yoann.rombouts@gmail.com (Y.R.); florent.colomb@ed.univ-lille1.fr (F.C.); yann.guerardel@univ-lille1.fr (Y.G.)

² INSERM U908, University of Sciences and Technologies of Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq, France; E-Mail: xuefen.lebourhis@univ-lille1.fr

[†] These authors contributed equally to this work.

[‡] Current address: Cancer Research Program, Garvan Institute of Medical Research, Darlinghurst, NSW 2010, Australia

[#] Current address: Department of Rheumatology, Leiden University Medical Center, 2300 RC Leiden, The Netherlands

^{*} Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: philippe.delannoy@univ-lille1.fr; Tel.: +33-320-436-923; Fax: +33-320-436-555.

Received: 18 June 2012; in revised form: 20 July 2012 / Accepted: 6 August 2012 /

Published: 10 August 2012

Abstract: Glycosphingolipids from the ganglio-series are usually classified in four series according to the presence of 0 to 3 sialic acid residues linked to lactosylceramide. The transfer of sialic acid is catalyzed in the Golgi apparatus by specific sialyltransferases that show high specificity toward glycolipid substrates. ST8Sia I (EC 2.4.99.8, SAT-II, SIAT 8a) is the key enzyme controlling the biosynthesis of b- and c-series gangliosides. ST8Sia I is expressed at early developmental stages whereas in adult human tissues, ST8Sia I transcripts are essentially detected in brain. ST8Sia I together with b- and c-series

gangliosides are also over-expressed in neuroectoderm-derived malignant tumors such as melanoma, glioblastoma, neuroblastoma and in estrogen receptor (ER) negative breast cancer, where they play a role in cell proliferation, migration, adhesion and angiogenesis. We have stably expressed ST8Sia I in MCF-7 breast cancer cells and analyzed the glycosphingolipid composition of wild type (WT) and GD3S+ clones. As shown by mass spectrometry, MCF-7 expressed a complex pattern of neutral and sialylated glycosphingolipids from globo- and ganglio-series. WT MCF-7 cells exhibited classical monosialylated gangliosides including G_{M3} , G_{M2} , and G_{M1a} . In parallel, the expression of ST8Sia I in MCF-7 GD3S+ clones resulted in a dramatic change in ganglioside composition, with the expression of b- and c-series gangliosides as well as unusual tetra- and pentasialylated lactosylceramide derivatives G_{Q3} ($II^3Neu5Ac_4-Gg_2Cer$) and G_{P3} ($II^3Neu5Ac_5-Gg_2Cer$). This indicates that ST8Sia I is able to act as an oligosialyltransferase in a cellular context.

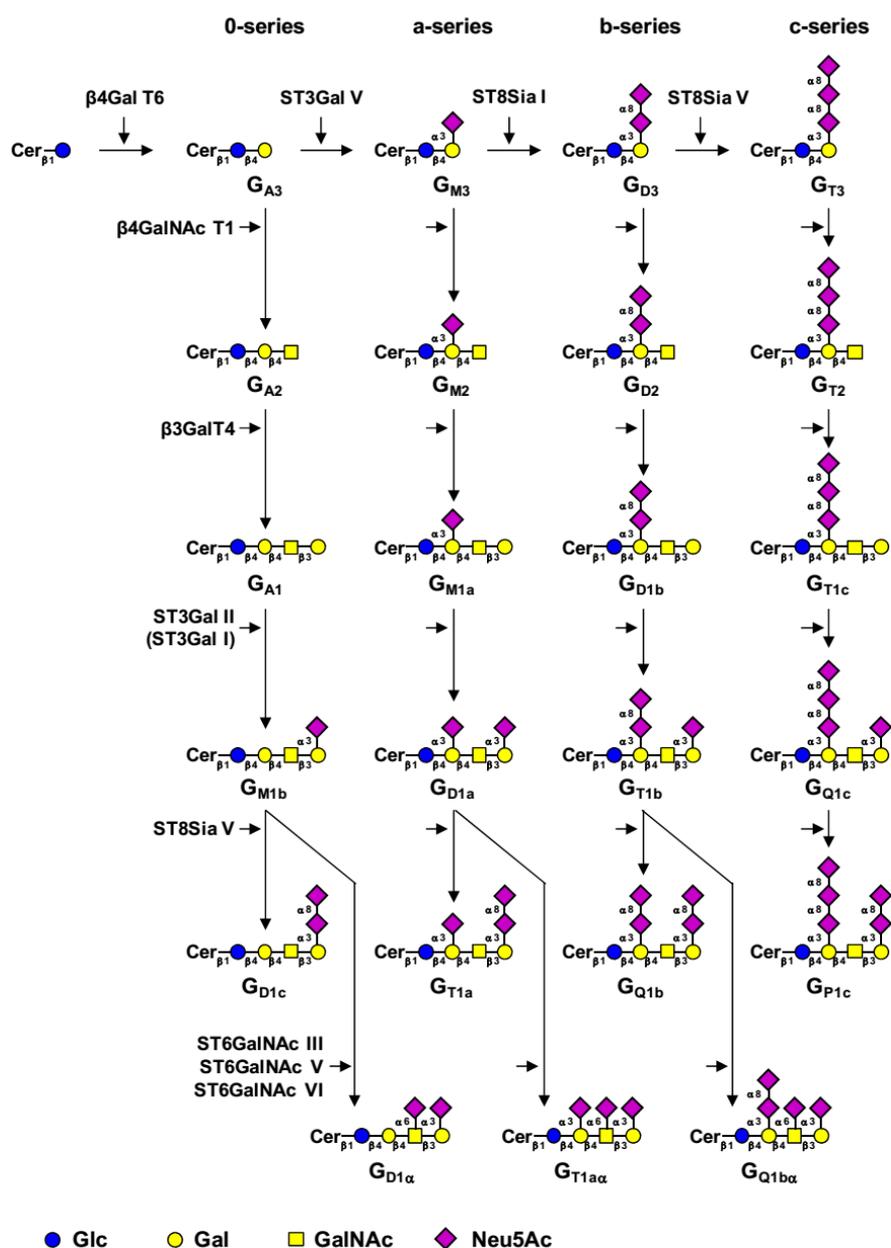
Keywords: gangliosides; G_{D3} synthase; MCF-7; unusual gangliosides

Abbreviations: BSA: Bovine Serum Albumin; Cer: ceramide; DMB: 1,2-diamino-4,5-methylenedioxybenzene; DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium; EDTA: Ethylenediaminetetraacetic Acid; DMSO: Dimethyl Sulfoxide; FBS: Fetal Bovine Serum; FITC: Fluorescein Isothiocyanate; FL-HPLC: Fluorescence Detection High Performance Liquid Chromatography; GD3S: G_{D3} synthase; GSL: glycosphingolipid; HPRT: Hypoxanthine PhosphoRibosylTransferase; HRP: horseradish peroxidase; LacCer: Lactosylceramide; mAb: monoclonal Antibody; MALDI-TOF: matrix assisted laser desorption-ionization time-of-flight; MS: Mass Spectrometry; PBS: Phosphate Buffered Saline; QPCR: Quantitative real-time Polymerase Chain Reaction; SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis; ST3Gal V: G_{M3} synthase; ST8Sia I: G_{D3} synthase; ST8Sia V: G_{T3} synthase; WT: Wild Type.

1. Introduction

Glycosphingolipids (GSL) from the ganglio-series are classified in four series according to the presence of 0 to 3 sialic acid residues linked to lactosylceramide ($Gal\beta 1-4Glc-Cer$, LacCer) [1]. The transfer of sialic acid to LacCer is catalyzed in the Golgi apparatus by specific sialyltransferases (namely ST3Gal V, ST8Sia I and ST8Sia V) that show high specificity toward glycolipid substrates [2]. LacCer, G_{M3} ($Neu5Ac\alpha 2-3Gal\beta 1-4Glc-Cer$, $II^3Neu5Ac_1-Gg_2Cer$), G_{D3} ($Neu5Ac\alpha 2-8Neu5Ac\alpha 2-3Gal\beta 1-4Glc-Cer$, $II^3Neu5Ac_2-Gg_2Cer$) and G_{T3} ($Neu5Ac\alpha 2-8Neu5Ac\alpha 2-8Neu5Ac\alpha 2-3Gal\beta 1-4Glc-Cer$, $II^3Neu5Ac_3-Gg_2Cer$) are therefore the precursors for 0-, a-, b- and c-series gangliosides and the biosynthesis of these compounds determine the relative proportion of gangliosides in each series (Figure 1). Elongation of the precursors can then occur by the sequential action of *N*-acetyl-galactosaminyltransferase ($\beta 4GalNAc T1$), galactosyltransferase ($\beta 3Gal T4$) and sialyltransferases (ST3Gal I, ST3Gal II and ST8Sia V), α -gangliosides deriving from the action of ST6GalNAc III, V or VI on G_{M1b} , G_{D1a} or G_{T1b} (Table 1).

Figure 1. Biosynthesis pathway for gangliosides. The code names of gangliosides are according to Svennerholm [1]. Cer: ceramide.



The sialyltransferase ST8Sia I (EC 2.4.99.8, SAT-II, SIAT 8a) is the only enzyme known to catalyze the transfer of a sialic acid residue onto G_{M3} through an $\alpha 2,8$ -linkage to synthesize G_{D3} . ST8Sia I and G_{D3} are expressed in fetal tissues at an early developmental stage [3,4] where they play a key role in cell-cell interaction, cell differentiation and proliferation [5], whereas in adult human tissues, ST8Sia I is essentially detected in the brain [6]. ST8Sia I and G_{D3} have been also shown to be over-expressed in neuroectoderm-derived malignant tumors such as melanoma, glioblastoma and neuroblastoma, and in estrogen receptor negative breast cancer [7–10].

Table 1. Glycosyltransferases involved in gangliosides biosynthesis. R = G_{A3}, G_{M3}, G_{D3} or G_{T3}.

<i>Gene</i>	<i>Common name</i>	<i>Main acceptor(s)</i>	<i>Accession #</i>	<i>Reference</i>
<i>UGCG</i>	GlcCer synthase	Ceramide	NM_003358	[18]
<i>B4GALT6</i>	LacCer synthase	Glucosylceramide	NM_004775	[19,20]
<i>ST3GAL5</i>	G _{M3} synthase	Lactosylceramide	NM_003896	[21]
<i>ST8SIA1</i>	G _{D3} synthase	G _{M3} , G _{D3}	NM_003034.2	[11–13]
<i>ST8SIA5</i>	G _{T3} synthase	G _{D3} , G _{M1b} , G _{D1a} , G _{T1b}	NM_013305	[17]
<i>B4GALNACT1</i>	G _{M2} /G _{D2} synthase	G _{A3} , G _{M3} , G _{D3} , G _{T3}	NM_001478.2	[22–24]
<i>B3GALT4</i>	G _{M1a} /G _{D1b} synthase	G _{A2} , G _{M2} , G _{D2} , G _{T2}	NM_003782.3	[23,25]
<i>ST3GAL1</i>	ST3Gal I	Galβ1-3GalNAcβ1-4-R	NM_003033	[26]
<i>ST3GAL2</i>	ST3Gal II	Galβ1-3GalNAcβ1-4-R	NM_006927	[27]
<i>ST6GALNAC3</i>	ST6GalNAc III	Neu5Acα2-3Galβ1-3GalNAcβ1-4-R	NM_152996	[28]
<i>ST6GALNAC5</i>	ST6GalNAc V	Neu5Acα2-3Galβ1-3GalNAcβ1-4-R	NM_030965.1	[29]
<i>ST6GALNAC6</i>	ST6GalNAc VI	Neu5Acα2-3Galβ1-3GalNAcβ1-4-R	NM_013443.3	[29]

The human ST8Sia I cDNA was simultaneously isolated by expression cloning by three research groups [11–13]. The *ST8SIA1* gene is located on chromosome 12, in p12.1-p11.2 and consists of five coding exons spanning over 135 kbp of genomic DNA [14]. ST8Sia I cDNA encodes a 341 amino acid membrane-bound Golgi enzyme with a 12 amino-acid cytoplasmic tail, a transmembrane domain of about 20 residues and a catalytic domain containing the conserved Sialyl motifs involved in substrate binding and transfer [15].

Whereas ST8Sia I mainly sialylates G_{M3}, Nakayama and co-workers have underlined its ability to synthesize G_{T3} from G_{D3} [6]. ST8Sia I was also shown to use G_{M1b}, G_{D1a} or G_{T1b} as acceptor substrates to synthesize G_{D1c}, G_{T1a} or G_{Q1b}, respectively, both *in vitro* and *in vivo* [16]. However, the α2,8-sialyltransferase ST8Sia V is a much better candidate for G_{T1a}/G_{Q1b} synthase activity [17] and no ST8Sia V activity was detected toward G_{M3}. Consequently, ST8Sia I is considered as the only G_{D3} synthase (GD3S) that controls the biosynthesis of gangliosides from the b- and c-series.

By stable transfection of the full-length cDNA of human G_{D3} synthase, we have isolated cellular clones deriving from MCF-7 breast cancer cells that constitutively express GD3S together with b- and c-series gangliosides. Here, we show by mass spectrometry and HPLC analysis that clones that express a high level of GD3S also accumulate unusual tetra- and pentasialylated derivatives of LacCer, G_{Q3} (II³Neu5Ac₄-Gg₂Cer) and G_{P3} (II³Neu5Ac₅-Gg₂Cer).

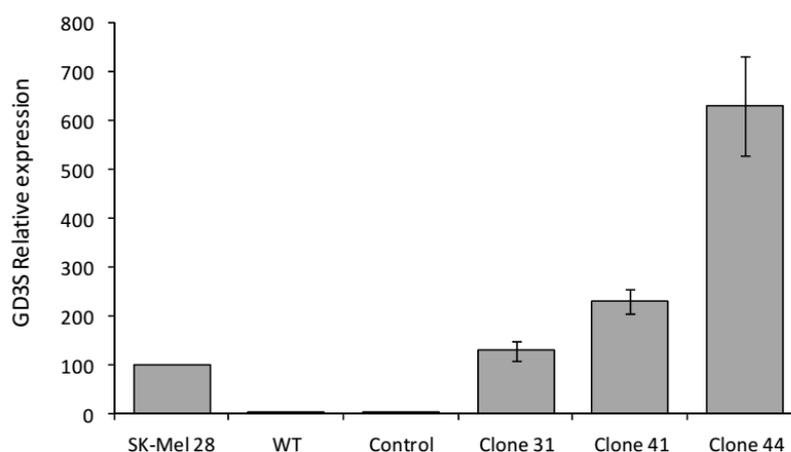
2. Results and Discussion

2.1. Analysis of ST8Sia I Expression by QPCR in Control and GD3S+ MCF-7 Clones

MCF-7 cells were transfected with the pcDNA3-GD3S expression vector containing the full-length cDNA of human GD3S or the empty pcDNA3 vector as control. Transfected cells were cultured 21 days in the presence of 1 mg/mL G418. Individual G418-resistant colonies were isolated by limiting dilution cloning. Forty-four clones were obtained and analyzed for the expression of GD3S. As previously shown [30], QPCR analysis of GD3S expression (Figure 2) indicates that GD3S mRNA is expressed at a very low level in wild-type and control (empty vector transfected) MCF-7 cells compared to SK-Mel 28 melanoma cells used as positive control [31]. Within the forty-four analyzed clones,

three GD3S+ clones (clone #31, #41 and #44) were selected according to the high expression of GD3S compared to SK-Mel 28 (1.3-fold, 2.3-fold and 6.3-fold, respectively) (Figure 2).

Figure 2. QPCR analysis of GD3S expression in control and GD3S+ MCF-7 clones. Quantification of GD3S expression was performed by the method described by Livak and Schmittgen [32] and normalized to HPRT. The expression of GD3S in MCF-7 cells was relative to SK-Mel 28, which was regarded as 100%.



2.2. Flow Cytometry Analysis of Gangliosides Expression in MCF-7 GD3S+ Clones

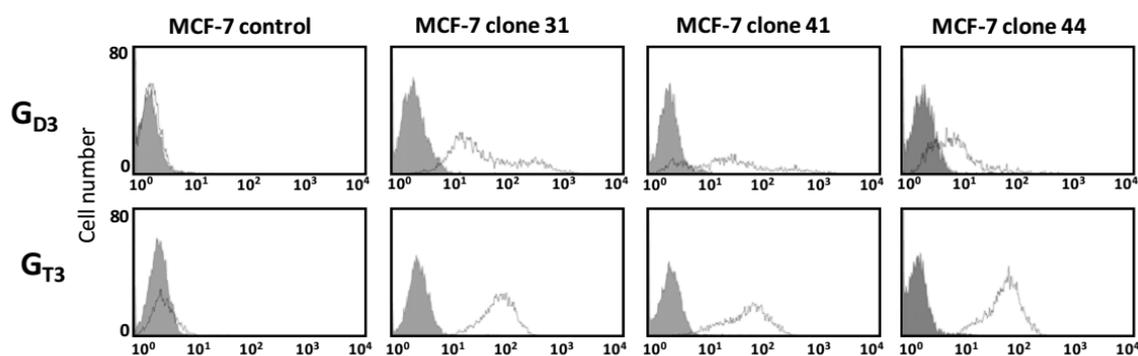
The pattern of gangliosides was monitored in the three selected MCF-7 GD3S+ clones (clone #31, #41, #44) by flow cytometry using anti-G_{D3} R24 and anti-G_{T3} A2B5 mAbs. As shown in Figure 3, the three GD3S+ clones expressed G_{D3} and G_{T3} whereas wild-type and control (empty vector transfected) MCF-7 cells did not express complex gangliosides. G_{T3} is expressed at a similar level in the three GD3S+ clones but a decrease of G_{D3} is observed in clone #44 compared to clone #31 and #41 whereas the expression level of GD3S was 4.8-fold or 2.7-fold higher in clone #44 compared to clone #31 and #41, respectively (Figure 2). Control cells showed no change in the ganglioside profile compared with wild-type MCF-7 (data not shown).

2.3. MS Analysis of Gangliosides in MCF-7 and GD3S+ Clones

Glycolipids were extracted from cells, purified by reverse phase chromatography and permethylated prior to MS analysis. Mass spectrometry analysis established that glycolipid profiles of MCF-7 WT and GD3S+ clones were characterized by complex patterns of neutral and sialylated glycosphingolipids from globo- and ganglio-series. Profiles of all cell lines were dominated by two signals at *m/z* 1460 and 1572 both identify based on their MALDI-TOF/TOF fragmentation patterns (data not shown) and in agreement with previously published analyses [33] as mixtures of G_{b4} and G_{A1} differing by the nature of their lipid moieties (d18:1-16:0 or d18:1-24:0). Along these two major components, MS and MS/MS analyses permitted us to identify other minor neutral GSLs including LacCer and G_{b3} (Figure 4). The comparison of MS profiles did not show any significant difference in neutral GSLs content between MCF-7 WT and GD3+ clones. On the contrary, the content in sialylated

glycolipids varied among the different cell lines. MCF-7 WT cells exhibited monosialylated gangliosides including G_{M3} , G_{M2} , and G_{M1} . The only disialylated GSL observed in MCF-7 WT cells was G_{D1} at m/z 2182 and 2194. Its sequence analysis by MALDI-TOF/TOF typified it as G_{D1a} , thus lacking disialylated motif (data not shown). $GD3^+$ clones did not show GSLs from the G2 and G1 families but synthesized instead a family of unusual highly sialylated lactosylceramide derivatives substituted by up to 5 Neu5Ac residues tentatively identified as G_{D3} , G_{T3} , G_{Q3} and G_{P3} . The structure of these four compounds was confirmed by MALDI-TOF/TOF sequencing.

Figure 3. Flow cytometry analysis of gangliosides in pcDNA3-GD3S transfected MCF-7 cells. Immunodetection of G_{D3} and G_{T3} was performed using anti- G_{D3} R24 (dilution 1:100) and anti- G_{T3} A2B5 (dilution 1:10) mAbs. The gray peaks correspond to the negative controls (incubation with secondary antibody alone, anti-mouse IgM or anti-mouse IgG labeled with Alexa 488).



The Glycolipid profile of SK-Mel 28 cells was also analyzed in respect to the presence of polysialylated lactosylceramide derivatives. Contrarily to MCF-7 WT cells, GSLs extracted from SK-Mel 28 cells did not contain globo-series but were dominated by ganglio-series, which induces much higher overall sialic acid content (data not shown). In particular, disialylated G_{D3} appears to be the major component along with monosialylated G_{M3} and trisialylated G_{T3} . However, the tetra- and pentsialylated gangliosides synthesized by MCF-7 $GD3^+$ clones were not detected in SK-Mel 28.

Figure 4. Comparison of MS profiles of permethylated glycosphingolipids purified from MCF-7 WT and $GD3S^+$ clone #44. All GSLs are present as $d18:1/C16:0$ (Cer*) and $d18:1/C24:0$ (Cer**) isomers. ○, Gal; ●, Glc; ■, GalNAc; ◆, Neu5Ac.

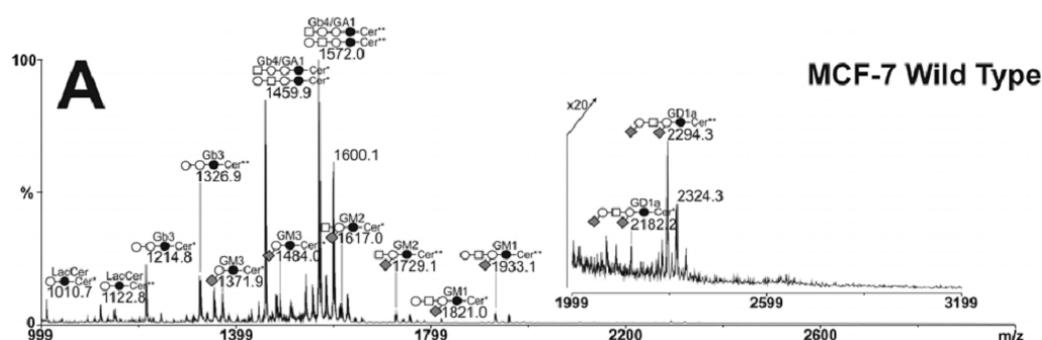
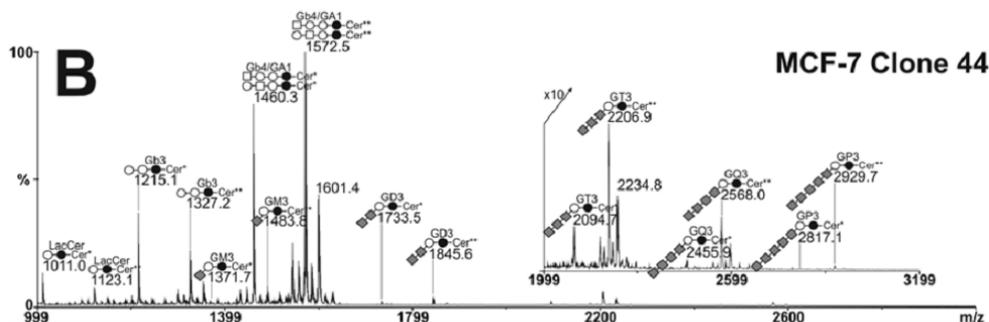
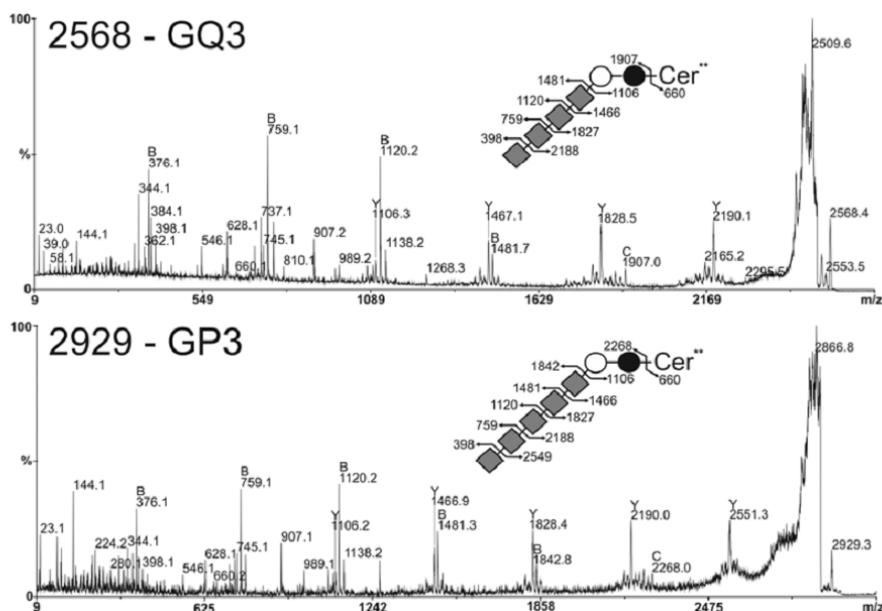


Figure 4. Cont.



We illustrate the sequence analyses of unusual G_{Q3} and G_{P3} in Figure 5. These two molecules differing in the presence of a single Neu5Ac residue were structurally related. They shared the fragmentation pattern of a linear stretch of four sialic acid residues in terminal non-reducing position as [M+Na]⁺ B-ions at *m/z* 398, 759, 1120 and 1481 and a linear sequence of Sia₄Hex₂Cer at reducing end as [M+Na]⁺ Y-ions at *m/z* 1106, 1466, 1827 and 2188. G_{P3} showed additional B and Y ions at *m/z* 1842 and 2551 typifying a linear Sia₅ sequence. Altogether, these data established that MCF-7 GD3⁺ clone #44 synthesizes an unusual family of oligosialylated lactosylceramide derivatives presented from 2 to 5 Neu5Ac residues. The disappearance of G_{M2}, G_{M1} and G_{D1a} in MCF-7 GD3⁺ clone #44 could be explained by the depletion of G_{M3} substrate caused by the over-expression of the GD3S⁺ that competes with β-4GalNAcT1 for the use of G_{M3} substrate.

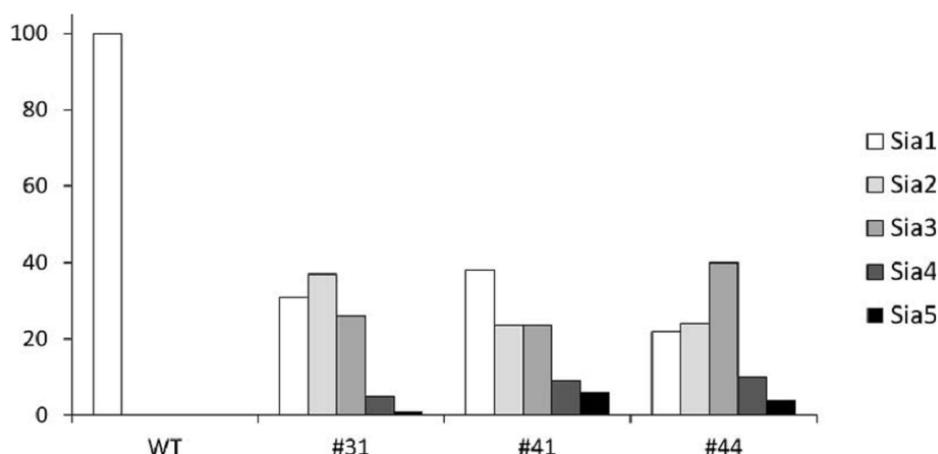
Figure 5. MS/MS sequencing of permethylated glycosphingolipids. Analysis of G_{Q3} at *m/z* 2568 (A) and G_{P3} at *m/z* 2929 (B) with ceramide moieties d18:1/C24:0 (Cer**). All fragments are observed as [M+Na]⁺ adducts except those at *m/z* at 376 and 660 observed as [M+H]⁺ adducts. Fragment ions were annotated according to nomenclature of Domon and Costello [34]. ○, Gal; ●, Glc; ■, GalNAc; ◆, Neu5Ac.



2.4. Quantification of Polysialylation Associated with Gangliosides by HPLC

Because mass spectrometry does not provide reliable quantitative data, we quantified the extent of oligosialylation modifications in GSLs induced by the overexpression of G_{D3} in MCF-7 by screening all three $GD3S+$ clones (#31, #41 and #44) (Figure 6). To do that, oligosialylated motifs were released from purified GSLs by mild hydrolysis according to optimized procedures [35] and labeled by DMB before separation and quantification by FL-HPLC [36]. The analysis of relative quantifications of sialic acid chains in GSLs of all MCF-7 $GD3S+$ clones compared to MCF-7 WT demonstrated a sharp increase of sialylation oligomerization degree, up to five residues, in accordance with mass spectrometry analysis. In MCF-7 WT, no oligosialylation could be observed, in accordance with the sole identification of G_{D1a} by MS. In contrast, all $GD3S+$ clones contained about 30% of Sia_2 and Sia_3 motifs, up to 10% of Sia_4 and up to 5% of Sia_5 . Although clones presented similar GSL oligosialylation profiles, small scale quantitative differences could be observed between the three clones, with a prevalence of higher DP values for clone #44 compared to clones #31 and #41.

Figure 6. Relative quantification of oligosialylation sequence on GSL of MCF-7 WT $GD3S+$ clones #31, clone #41 and clone #44 by FL-HPLC after DMB derivation.



3. Experimental Section

3.1. Antibodies and Reagents

Anti- G_{D3} R24 mAb was purchased from Abcam (Cambridge, UK) and anti- G_{T3} A2B5 mAb was kindly provided by Pr. Jacques Portoukalian (Depart. of Transplantation and Clinical Immunology, Claude Bernard University and Edouard Herriot Hospital, Lyon, France). FITC-conjugated sheep anti-mouse IgG was from GE Healthcare (Templemars, France). FITC-conjugated anti-mouse IgM was purchased from Molecular Probes (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

3.2. Cell Culture

The breast cancer cell line MCF-7 and the melanoma cell line SK-Mel 28 were obtained from the American Type Cell Culture Collection. Cell culture reagents were purchased from Lonza

(Levallois-Perret, France). Cells were routinely grown in monolayer and maintained at 37 °C in an atmosphere of 5% CO₂, in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine, and 100 units/mL penicillin-streptomycin. GD3S positive (GD3S+) MCF-7 clones were obtained by stable transfection of the pcDNA3-GD3S expression vector encoding the full-length human G_{D3} synthase [37] as previously described [33]. Individual resistant colonies were isolated by limit dilution. Three positive clones (#31, #41 and #44), expressing different levels of GD3S were used for further study. Control cells (empty vector transfected) and GD3S+ clones were cultured in the presence of 1 mg/mL G418 (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France).

3.3. Quantitative Real-Time-PCR (QPCR) Analysis of G_{D3} Synthase

Total RNA was extracted using the Nucleospin RNA II kit (Macherey Nagel, Hoerd, France), quantified using a NanoDrop spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, USA) and the purity of the preparation was checked by ratio of the absorbance at 260 and 280 nm. The cDNA was synthesized using 2 µg of RNA (GE Healthcare). PCR primers for GD3S and Hypoxanthine PhosphoRibosylTransferase (HPRT) were previously described [30,38] and synthesized by Eurogentec (Seraing, Belgium). PCR reactions (25 µL) were performed using 2X SYBR[®] Green Universal QPCR Master Mix (Stratagene, Amsterdam, The Netherlands), with 2 µL of cDNA solution and 300 nM final concentration of each primer. PCR conditions were as follows: 95 °C for 30 s, 51 °C for 45 s, 72 °C for 30 s (40 cycles). Assays were performed in triplicate and GD3S transcript expression level was normalized to HPRT using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method described by Livak and Schmittgen [32]. Serial dilutions of the appropriate positive control cDNA sample were used to create standard curves for relative quantification and negative control reactions were performed by replacing cDNA templates by sterile water.

3.4. Analysis of Cell Surface Ganglioside by Flow Cytometry

Cells were washed in cold PBS and detached by EDTA 2 mM. Cells were incubated at 4 °C during 1 h with anti-G_{D3} R24 (1:100) and anti-G_{T3} A2B5 (1:10), diluted in phosphate buffered saline (PBS) containing 0.5% bovine serum albumin (PBS-BSA) (Sigma-Aldrich). After washing with PBS-BSA, cells were incubated on ice during 1 h with Alexa Fluor 488 anti-IgG or anti-IgM (1:500). After two washes in PBS-BSA, cells were analyzed by flow cytometry (FACScalibur, Becton Dickinson). Control experiments were performed using secondary antibody alone.

3.5. Extraction and Preparation of Glycolipids

Twenty dishes (10 cm diameter) of cultured cells were washed twice with ice-cold PBS and cells were scraped and sonicated on ice in 200 µL of water. The resulting material was dried under vacuum and sequentially extracted by CHCl₃/CH₃OH (2:1, v/v), CHCl₃/CH₃OH (1:1, v/v) and CHCl₃/CH₃OH/H₂O (1:2:0.8, v/v/v). Supernatants were pooled, dried and subjected to a mild saponification in 0.1 M NaOH in CHCl₃/CH₃OH (1:1) at 37 °C for 2 h and then evaporated to dryness [39]. Samples were reconstituted in CH₃OH/H₂O (1:1, v/v) and applied to a reverse phase C₁₈

cartridge (Waters, Milford, MA, USA) equilibrated in the same solvent. After washing with CH₃OH/H₂O (1:1, v/v), GSLs were eluted by CH₃OH, CHCl₃/CH₃OH (1:1, v/v) and CHCl₃/CH₃OH (2:1, v/v).

3.6. Mass Spectrometry Analysis of GSL

Prior to mass spectrometry analysis, GSL were permethylated according to Ciucanu and Kerek [40]. Briefly, compounds were incubated 2 h in a suspension of 200 mg/mL NaOH in dry DMSO (300 µL) and CH₃I (200 µL). The methylated derivatives were extracted in CHCl₃ and washed several times with water. The reagents were evaporated and the sample was dissolved in CHCl₃ in the appropriate dilution. MALDI-MS and MS/MS analyses of permethylated GSL were performed on 4800 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA) mass spectrometer, operated in the reflectron mode. For MS acquisition, 5 µL of diluted permethylated samples in CHCl₃ were mixed with 5 µL of 2,5-dihydroxybenzoic acid matrix solution (10 mg/mL dissolved in CHCl₃/CH₃OH (1:1, v/v)). The mixtures (2 µL) were then spotted on the target plate and air dried. MS survey data comprises a total of 50 sub-spectra of 1500 laser shots. Peaks observed in the MS spectra were selected for further MS/MS. CID MS/MS data comprises a total of 100 sub-spectra of 3000 laser shots. Two or more spectra can be combined post-acquisition with mass tolerance set at 0.1 Da to improve S/N ratio. The potential difference between the source acceleration voltage and the collision cell was set to 1 kV and argon was used as collision gas.

3.7. Analysis of Oligo-Sialylated Sequences by HPLC

In order to minimize internal fragmentation of polysialylated sequences, sialylated glycan samples were directly coupled to 1,2-diamino-4,5-methylenedioxybenzene (DMB) without prior mild hydrolysis [35]. Samples were incubated for 2.5 h at 50 °C in 50 µL of a DMB reagent solution (2.7 mM DMB, 9 mM sodium hydrosulfite, and 0.5 mM β-mercaptoethanol in 20 mM TFA). 10 µL of 1 M NaOH was then added and the reaction mixtures further incubated in the dark at room temperature for 1 h. Samples were stored at 4 °C before analysis. DMB-derivatized sialic acid oligomers were separated on a HPLC apparatus fitted with a CarboPac PA-100 column (Dionex). CarboPac column was eluted at 1 mL/min with a concentration gradient of 2 to 32% of 1 M NaNO₃ in water. Elution was monitored by an on line fluorescence detector set at wavelengths of 373 nm for excitation and 448 nm for emission.

4. Conclusions

ST8Sia I is the only sialyltransferase able to transfer a sialic acid residue onto G_{M3} to synthesize G_{D3} and is therefore considered as the G_{D3} synthase. The animal ST8Sia family can be divided in three groups according to the capacity to carry out poly-, oligo- and mono-α2,8-sialylation and phylogenetic analyses have clearly associated ST8Sia I to the group of mono-α2,8-sialyltransferase [41]. However, by expression cloning of the human G_{T3} synthase, Nakayama and co-workers have underlined the ability of ST8Sia I to synthesize G_{T3} from G_{D3} [6]. Here, we show, for the first time, that ST8Sia I is able to synthesize unusual highly sialylated lactosylceramide derivatives substituted by up to

5 Neu5Ac residues and identified as G_{Q3} (II³Neu5Ac₄-Gg₂Cer) and G_{P3} (II³Neu5Ac₅-Gg₂Cer), showing that this enzyme can act as an oligosialyltransferase.

In humans, the *ST8SIAL1* gene is located on chromosome 12, in p12.1-p11.2 and consists of five coding exons spanning over 135 kbp of genomic DNA [14]. Two initiation codons on the first exon lead to two protein isoforms of 356 or 341 amino acids that differ in their N-terminal part. However, the relative capacity of each isoform to transfer more than two sialic acid residues has not been evaluated. By *in vitro* sialyltransferase assay, a recombinant soluble form of the human G_{D3} synthase was shown to synthesize, after a long period of incubation, higher polysialogangliosides, which presumably have more than three sialic acid residues but these compounds were not characterized [6].

From a general point of view, the occurrence of oligosialylation associated with glycolipids has been rarely reported so far. One exception is the recent identification of polysialogangliosides containing α 2,8-linked polyNeu5Ac with DPs ranging from 2 to at least 16 in sea urchin sperm head [42]. However, to our knowledge, tetra- and pentasialylated lactosylceramide derivatives have never been described in human tissues and cells. Although SK-Mel 28 cells that constitutively express high levels of GD3S, synthesize high quantities of G_{D3} and G_{T3}, we were not able to detect these unusual tetra- and pentasialylated gangliosides in this cell line. Indeed, in our cellular model, these unusual structures were obtained after transfection of GD3S cDNA and may not exist in natural conditions, and the depletion of G_{M3} in GD3S⁺ MCF-7 clones could explain that GD3S used other gangliosides, such as G_{T3} or G_{Q3}, as acceptor substrates. Nevertheless, one may thus expect that revisiting the structure of human gangliosides with recent high sensitivity mass spectrometry techniques will uncover oligosialylated glycolipids in cancerous cell lines and in normal or pathological tissues.

Acknowledgments

This work was supported by the University of Sciences and Technologies of Lille, the Association pour la Recherche sur le Cancer (Grant n° 7936 and 5023) et le comité de l’Aisne de La Ligue contre le Cancer. Florent Colomb is supported by a PhD fellowship from “Vaincre la mucoviscidose”.

References

1. Svennerholm, L. Ganglioside designation. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1980**, *125*, 11–19.
2. Zeng, G.; Yu, R.K. Cloning and transcriptional regulation of genes responsible for synthesis of gangliosides. *Curr. Drug Targets* **2008**, *9*, 317–324.
3. Yamamoto, A.; Haraguchi, M.; Yamashiro, S.; Fukumoto, S.; Furukawa, K.; Takamiya, K.; Atsuta, M.; Shiku, H.; Furukawa, K. Heterogeneity in the expression pattern of two ganglioside synthase genes during mouse brain development. *J. Neurochem.* **1996**, *66*, 26–34.
4. Yu, R.K.; Macala, L.J.; Taki, T.; Weinfield, H.M.; Yu, F.S. Developmental changes in ganglioside composition and synthesis in embryonic rat brain. *J. Neurochem.* **1988**, *50*, 1825–1829.
5. Yamashita, T.; Wada, R.; Sasaki, T.; Deng, C.; Bierfreund, U.; Sandhoff, K.; Proia, R.L. A vital role for glycosphingolipid synthesis during development and differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 9142–9147.

6. Nakayama, J.; Fukuda, M.N.; Hirabayashi, Y.; Kanamori, A.; Sasaki, K.; Nishi, T.; Fukuda, M. Expression cloning of a human GT3 synthase. GD3 and GT3 are synthesized by a single enzyme. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 3684–3691.
7. Furukawa, K.; Hamamura, K.; Aixinjueluo, W.; Furukawa, K. Biosignals modulated by tumor-associated carbohydrate antigens novel targets for cancer therapy. *Ann. NY Acad. Sci.* **2006**, *1086*, 185–198.
8. Oblinger, J.L.; Pearl, D.K.; Boardman, C.L.; Saqr, H.; Prior, T.W.; Scheithauer, B.W.; Jenkins, R.B.; Burger, P.C.; Yates, A.J. Diagnostic and prognostic value of glycosyltransferase mRNA in glioblastoma multiforme patients. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **2006**, *32*, 410–418.
9. Ruan, S.; Lloyd, K.O. Glycosylation pathways in the biosynthesis of gangliosides in melanoma and neuroblastoma cells relative glycosyltransferase levels determine ganglioside patterns. *Cancer Res.* **1992**, *52*, 5725–5731.
10. Ruckhäberle, E.; Rody, A.; Engels, K.; Gaetje, R.; von Minckwitz, G.; Schiffmann, S.; Grösch, S.; Geisslinger, G.; Holtrich, U.; Karn, T.; Kaufmann, M. Microarray analysis of altered sphingolipid metabolism reveals prognostic significance of sphingosine kinase 1 in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **2008**, *112*, 41–52.
11. Nara, K.; Watanabe, Y.; Maruyama, K.; Kasahara, K.; Nagai, Y.; Sanai, Y. Expression cloning of a CMP-NeuAcNeuAc alpha 2-3Gal beta 1-4Glc beta 1-1'Cer alpha 2,8-sialyltransferase (GD3 synthase) from human melanoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 7952–7956.
12. Sasaki, K.; Kurata, K.; Kojima, N.; Kurosawa, N.; Ohta, S.; Hanai, N.; Tsuji, S.; Nishi, T. Expression cloning of a GM3-specific alpha-2,8-sialyltransferase (GD3 synthase). *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 15950–15956.
13. Haraguchi, M.; Yamashiro, S.; Yamamoto, A.; Furukawa, K.; Takamiya, K.; Lloyd, K.O.; Shiku, H.; Furukawa, K. Isolation of GD3 synthase gene by expression cloning of GM3 alpha-2,8-sialyltransferase cDNA using anti-GD2 monoclonal antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 10455–10459.
14. Furukawa, K.; Horie, M.; Okutomi, K.; Sugano, S.; Furukawa, K. Isolation and functional analysis of the melanoma specific promoter region of human GD3 synthase gene. *Biochim. Biophys. Acta* **2003**, *1627*, 71–78.
15. Harduin-Lepers, A.; Vallejo-Ruiz, V.; Krzewinski-Recchi, M.A.; Samyn-Petit, B.; Julien, S.; Delannoy, P. The human sialyltransferase family. *Biochimie* **2001**, *83*, 727–737.
16. Nara, K.; Watanabe, Y.; Kawashima, I.; Tai, T.; Nagai, Y.; Sanai, Y. Acceptor substrate specificity of a cloned GD3 synthase that catalyzes the biosynthesis of both GD3 and GD1c/GT1a/GQ1b. *Eur. J. Biochem.* **1996**, *238*, 647–652.
17. Kim, Y.J.; Kim, K.S.; Do, S.; Kim, C.H.; Kim, S.K.; Lee, Y.C. Molecular cloning and expression of human alpha2,8-sialyltransferase (hST8Sia V). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, *235*, 327–330.
18. Ichikawa, S.; Sakiyama, H.; Suzuki, G.; Hidari, K.I.; Hirabayashi, Y. Expression cloning of a cDNA for human ceramide glucosyltransferase that catalyzes the first glycosylation step of glycosphingolipid synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 4638–4643.
19. Nomura, T.; Takizawa, M.; Aoki, J.; Arai, H.; Inoue, K.; Wakisaka, E.; Yoshizuka, N.; Imokawa, G.; Dohmae, N.; Takio, K.; *et al.* Purification, cDNA cloning, and expression of UDP-Gal:

- Glucosylceramide beta-1,4-galactosyltransferase from rat brain. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 13570–13577.
20. Takizawa, M.; Nomura, T.; Wakisaka, E.; Yoshizuka, N.; Aoki, J.; Arai, H.; Inoue, K.; Hattori, M.; Matsuo, N. cDNA cloning and expression of human lactosylceramide synthase. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1438*, 301–304.
 21. Ishii, A.; Ohta, M.; Watanabe, Y.; Matsuda, K.; Ishiyama, K.; Sakoe, K.; Nakamura, M.; Inokuchi, J.; Sanai, Y.; Saito, M. Expression cloning and functional characterization of human cDNA for ganglioside GM3 synthase. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 31652–31655.
 22. Nagata, Y.; Yamashiro, S.; Yodoi, J.; Lloyd, K.O.; Shiku, H.; Furukawa, K. Expression cloning of beta 1,4 N-acetylgalactosaminyltransferase cDNAs that determine the expression of GM2 and GD2 gangliosides. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 12082–12089.
 23. Iber, H.; Zacharias, C.; Sandhoff, K. The c-series gangliosides GT3, GT2 and GP1c are formed in rat liver Golgi by the same set of glycosyltransferases that catalyse the biosynthesis of asialo-, a- and b-series gangliosides. *Glycobiology* **1992**, *2*, 137–142.
 24. Yamashiro, S.; Haraguchi, M.; Furukawa, K.; Takamiya, K.; Yamamoto, A.; Nagata, Y.; Lloyd, K.O.; Shiku, H.; Furukawa, K. Substrate specificity of beta 1,4-N-acetylgalactosaminyltransferase *in vitro* and in cDNA-transfected cells. GM2/GD2 synthase efficiently generates asialo-GM2 in certain cells. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 6149–6155.
 25. Amado, M.; Almeida, R.; Carneiro, F.; Levery, S.B.; Holmes, E.H.; Nomoto, M.; Hollingsworth, M.A.; Hassan, H.; Schwientek, T.; Nielsen, P.A.; *et al.* A family of human beta3-galactosyltransferases. Characterization of four members of a UDP-galactose: Beta-N-acetylglucosamine/beta-N-acetyl-galactosamine beta-1,3-galactosyltransferase family. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 12770–12778.
 26. Kitagawa, H.; Paulson, J.C. Differential expression of five sialyltransferase genes in human tissues. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 17872–17878.
 27. Giordanengo, V.; Bannwarth, S.; Laffont, C.; van Miegem, V.; Harduin-Lepers, A.; Delannoy, P.; Lefebvre, J.C. Cloning and expression of cDNA for a human Gal(beta1-3)GalNAc alpha2,3-sialyltransferase from the CEM T-cell line. *Eur. J. Biochem.* **1997**, *247*, 558–566.
 28. Tsuchida, A.; Ogiso, M.; Nakamura, Y.; Kiso, M.; Furukawa, K.; Furukawa, K. Molecular cloning and expression of human ST6GalNAc III: Restricted tissue distribution and substrate specificity. *J. Biochem.* **2005**, *138*, 237–243.
 29. Harduin-Lepers, A.; Mollicone, R.; Delannoy, P.; Oriol, R. The animal sialyltransferases and sialyltransferase-related genes: A phylogenetic approach. *Glycobiology* **2005**, *15*, 805–817.
 30. Cazet, A.; Groux-Degroote, S.; Teylaert, B.; Kwon, K.M.; Lehoux, S.; Slomianny, C.; Kim, C.H.; Le Bourhis, X.; Delannoy, P. GD3 synthase overexpression enhances proliferation and migration of MDA-MB-231 breast cancer cells. *Biol. Chem.* **2009**, *390*, 601–609.
 31. Ruan, S.; Raj, B.K.; Lloyd, K.O. Relationship of glycosyltransferases and mRNA levels to ganglioside expression in neuroblastoma and melanoma cells. *J. Neurochem.* **1999**, *72*, 514–521.
 32. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **2001**, *25*, 402–408.

33. Steenackers, A.; Cazet, A.; Bobowski, M.; Rombouts, Y.; Lefebvre, J.; Guérardel, Y.; Tulasne, D.; Le Bourhis, X.; Delannoy, P. Expression of GD3 synthase modifies ganglioside profile and increases migration of MCF-7 breast cancer cells. *C.R. Chim.* **2012**, *15*, 3–14.
34. Domon, B.; Costello, C.E. A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates. *Glycoconjug. J.* **1988**, *5*, 397–409.
35. Sato, C.; Inoue, S.; Matsuda, T.; Kitajima, K. Fluorescent-assisted detection of oligosialyl units in glycoconjugates. *Anal. Biochem.* **1999**, *266*, 102–109.
36. Chang, L.-Y.; Harduin-Lepers, A.; Kitajima, K.; Sato, C.; Huang, C.-J.; Khoo, K.-H.; Guérardel, Y. Developmental regulation of oligosialylation in zebrafish. *Glycoconjug. J.* **2009**, *26*, 247–261.
37. Moon, S.K.; Kim, H.M.; Lee, Y.C.; Kim, C.H. Disialoganglioside (GD3) synthase gene expression suppresses vascular smooth muscle cell responses via the inhibition of ERK1/2 phosphorylation, cell cycle progression, and matrix metalloproteinase-9 expression. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 33063–33070.
38. Zhang, X.; Ding, L.; Sandford, A.J. Selection of reference genes for gene expression studies in human neutrophils by real-time PCR. *BMC Mol. Biol.* **2005**, *6*, 4.
39. Schnaar, R.L. Isolation of glycosphingolipids. *Methods Enzymol.* **1994**, *230*, 348–370.
40. Ciucanu, I.; Kerek, F. Rapid and simultaneous methylation of fatty and hydroxy fatty acids for gas-liquid chromatographic analysis. *J. Chromatogr.* **1984**, *284*, 179–185.
41. Harduin-Lepers, A.; Petit, D.; Mollicone, R.; Delannoy, P.; Petit, J.-M.; Oriol, R. Evolutionary history of the alpha2,8-sialyltransferase (ST8Sia) gene family: Tandem duplications in early deuterostomes explain most of the diversity found in the vertebrate ST8Sia genes. *BMC Evol. Biol.* **2008**, *8*, 258.
42. Miyata, S.; Yamakawa, N.; Toriyama, M.; Sato, C.; Kitajima, K. Co-expression of two distinct polysialic acids, α 2,8- and α 2,9-linked polymers of *N*-acetylneuraminic acid, in distinct glycoproteins and glycolipids in sea urchin sperm. *Glycobiology* **2011**, *21*, 1596–1605.

Sample Availability: Not available.

© 2012 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

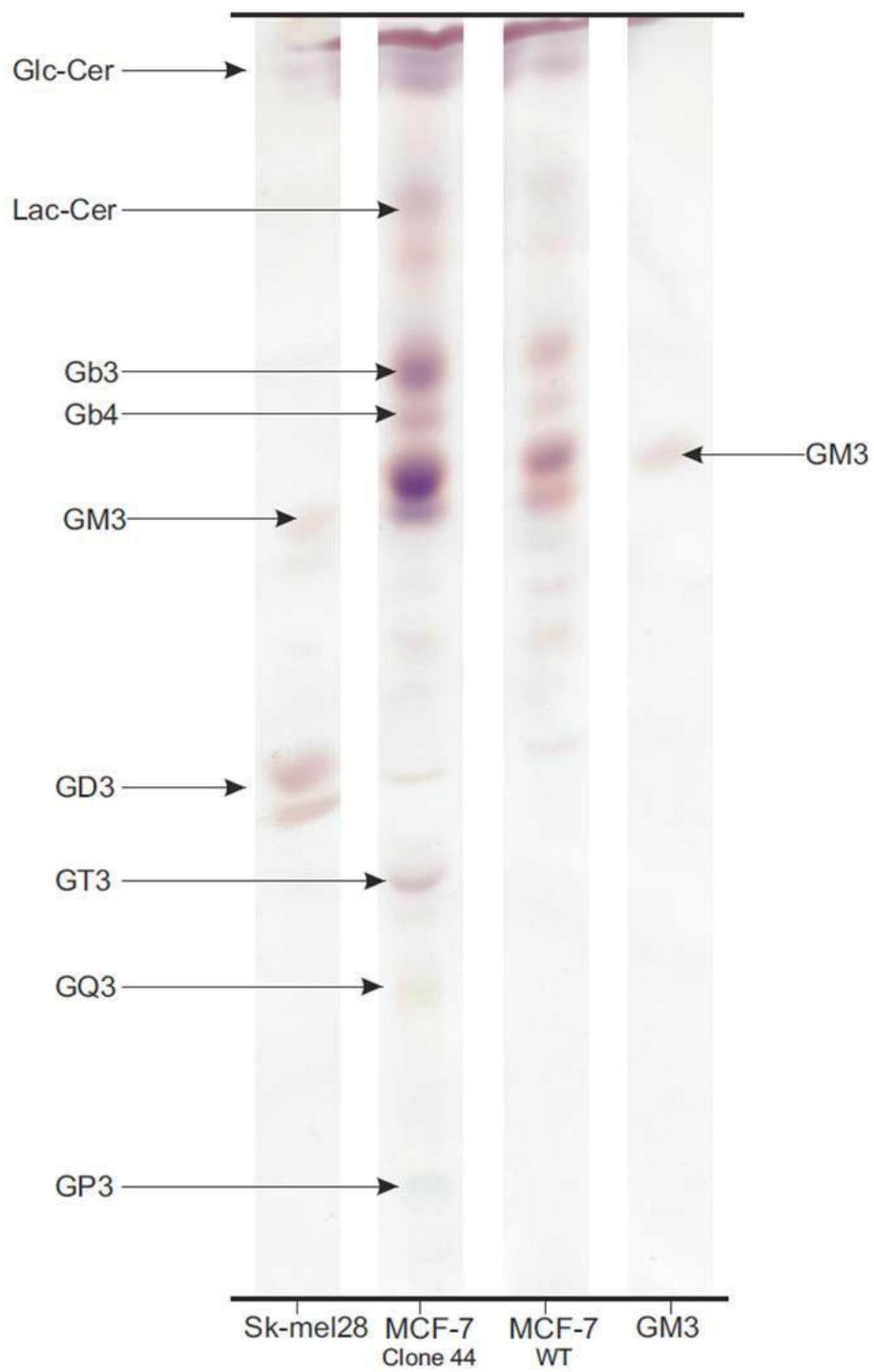


Figure 83 : CCM de silice des GSL des cellules Sk-Mel28, MCF-7 WT et clone 44.

Matériels et Méthodes

Matériels et Méthodes

A / Analyses Structurales :

A1 - Culture Cellulaire :

La lignée cellulaire hépatocytaire du poisson-zèbre (*Danio rerio*) ZFL a été obtenue auprès de l'ATCC (numéro ATCC: CRL2643) (normes de LGC, Molsheim, France) ([Ghosh, Zhou et al. 1994](#)). Les cellules ont été cultivées dans 50% Leibovitz L-15 (ATCC), 35% DMEM (Gibco), et 15% Ham F-12 (Gibco), supplémenté avec : 15 mM d'HEPES ; 0,15 g/mL de NaHCO₃ ; 0,01 mg/ml d'insuline ; 50 ng/ml facteur de croissance épidermique (EGF) et 5% de sérum de veau fœtal inactivé par la chaleur comme proposé par l'ATCC. Les cellules ont été cultivées à 28°C dans des flacons de culture de 75 cm². Les cellules ont été repiquées tous les 5-7 jours dans 3 nouveaux flacons de culture. Elles ont d'abord été rincées avec 1 ml avec 0,25% de Trypsine EDTA (Gibco), puis détachées avec 1 mL de trypsine EDTA. La digestion de la trypsine a été arrêtée par l'addition d'1 mL de FBS à 10% contenant du milieu.

A2 - Elevage et Manipulation du Poisson Zèbre :

Les poissons zèbres de type Tuebingen ont été achetés auprès du site du ZIRC (<http://zebrafish.org/zirc/home/guide.php>) et ont été élevés en suivant les conseils du « *ZF Book* » de Westerfield M. au sein de l'animalerie de l'université de Lille 1 dans un système d'aquariums TECHNIPLAST® dans une eau à 28°C avec un pH de 7.2 et une conductivité de 500 µS. Les poissons ont été soumis à un cycle jour/nuit de 14h de lumière et de 10h d'obscurité. Les poissons ont été anesthésiés et euthanasiés par un bain d'eau froide à 4°C pendant 20 min d'après la procédure en vigueur ([Matthews and Varga 2012](#)). Les 10 poissons mâles et femelles ont été disséqués immédiatement après leurs sacrifices sous une loupe binoculaire conformément à la vidéo suivante ([Gupta and Mullins 2010](#)). Les organes ont ensuite été prélevés et conservés à -80°C. Les embryons ont été collectés suite à plusieurs pontes et leur niveau de développement a été contrôlé. Ils ont également été conservés à -80°C.

A3 - Séparation des glycoconjugués :

Les volumes des extractions sont donnés à titre indicatif et s'appliquent à une extraction de culots cellulaires (mg) ou d'organes (g). Les échantillons cellulaires et tissulaires collectés sont lavés par du tampon de phosphate salin (PBS) (3,2 mM Na₂HPO₄, 0,5 mM KH₂PO₄, 1,3 mM de KCl, 135 mM NaCl, pH 7,4), dilacérés et centrifugés à 400 g. Le

culot est séché par lyophilisation, puis les glycosphingolipides sont extraient séquentiellement du culot par les mélanges de solvants suivants : 2 mL de chloroforme/méthanol (2:1, v/v), 2 mL de chloroforme/méthanol (1:1, v/v) et 2 mL de chloroforme/méthanol/eau (1:2:0,8, v/v/v). Les 3 fractions de glycosphingolipides sont rassemblées et séchées sous flux d'azote et conservées à -20°C. Le culot dé-lipidé est séché et utilisé pour l'analyse des glycoprotéines.

A4 - Purification des glycosphingolipides :

Les extractions de glycolipides déshydratées subissent une dé-O-acylation par ajout de 2 mL de soude à 0,1 % dans du chloroforme/méthanol (1/1, v/v) pendant 4h à 37°C. Puis, les GSL sont neutralisés à pH neutre et purifiés sur colonne C18 (Sep Pack, Waters®) par des lavages avec au méthanol/eau (1/1, v/v) et une élution en présence de méthanol pur, de chloroforme/méthanol (1/1, v/v) et de chloroforme/méthanol (2/1, v/v). Les fractions d'élution sont mélangées et séchées, puis une fraction (5%) des GSL sont perméthylés pour être analysés en spectrométrie de masse.

A5 - Séparation des glycosphingolipides par Chromatographie-*flash* :

La chromatographie-*flash* a été réalisée grâce un système des colonnes Interchim de 4g de silice (diamètre 15 µm) et d'une pompe à basse pression (30 Bars). Les GSL purifiés des ovaires du poisson zèbre adulte ont été séparés grâce à une élution dans mélange de solvant constitué de CHCl₃ (A), MeOH (B) et H₂O (C) à un débit de 3mL/min et une collecte de 3mL/tube. L'élution commence par 100% de A pour éluer les constituants les plus hydrophobes (Ag) puis évolue vers 100% de B au tube 55 que se poursuit jusqu'au tube 70. Enfin, un solvant B/C (80:20, v/v) est appliqué jusqu'au tube 81 pour éluer les constituants les plus hydrophyles des GSL. Une migration sur couche mince de silice et une révélation à l'orcinol sont ensuite utilisées pour délimiter les différentes fractions de GSL.

A6 - La chromatographie sur couche mince :

Les chromatographies sur couche mince (CCM) sont réalisées sur des plaques de silice (TLC Silica gel 60 - MERCK). La séparation a été effectuée en utilisant un mélange de CHCl₃/MeOH/H₂O (55:40:5 ; v/v/v) dans une cuve chromatographique saturée avec ce même solvant. Les chromatographie ont pour but d'identifier la présence de glycolipides ou d'analogues glycaniques par la pulvérisation d'un mélange de 2% d'orcinol et d'acide sulfurique 20% dans l'eau et une révélation à 110°C pendant 5 minutes.

A7 – Digestion enzymatique par l'endocéramidase

Les glycolipides purifiés sont digérés par 20 mU (20 µL) de Endo-β-glycocéramidase II de *Rhodococcus* sp. (Sigma-Aldrich) dans 80 µL d'acétate de sodium aqueux à 50 mM avec 0,1% de taurodésoxycholate de sodium (Sigma-Aldrich) à un pH de 5,0 à 37°C pendant 72 h. Les glycanes libérés ont été successivement purifiés sur une colonne Sep-Pak C18 (Waters; 500 mg) et sur colonne Carbograph (Alltech; 150 mg). En résumé, les GSL digérés ont été injectés sur une colonne C18 Sep-Pak équilibrée dans du méthanol/eau (1:1, v/v) et élué avec du méthanol/eau (1:1, v/v, 12 ml). La fraction recueillie est séchée, reconstituée dans 1 ml d'eau et injectée sur une colonne Carbograph équilibrée dans l'eau. La colonne *Carbograph* a été rincée avec 12 ml d'eau et élue avec 6 ml d'une solution d'acétonitrile/eau (1:3, v/v). La solution d'acétonitrile contenant les glycanes d'intérêts a été séchée et 5% ont été perméthylés pour être analysés en MS.

A8 - Isolation des N- et O-glycannes des glycoprotéines :

Le culot protéique dé-lipidé est repris et agité pendant 4 heures à 4°C dans 1 mL d'une solution d'hydrochlorure de guanidine à 6 M, d'EDTA à 5 mM et de Tris/HCl au pH 8 à 0,1 M. Le dithiothréitol (DTT) est ajouté à une concentration finale de 20 mM et la solution est incubée pendant 5 h à 37°C. Puis, l'iodo-acétamide (IAA) est ajouté à une concentration finale de 50 mM et la solution est incubée pendant une nuit dans l'obscurité à température ambiante. Les protéines solubilisées, réduites et alkylées sont dialysées dans l'eau à 4°C pendant 3 j, puis les protéiques dessalées sont lyophilisées. Celles-ci sont ensuite reprises dans un tampon d'ammonium bicarbonate de 50 mM de pH 8,4 et digérées séquentiellement par de la trypsine traitée (7,5 U pour 1 mg de protéines à digérer) pendant 5 h à 37°C et par de la chymotrypsine (1 U pour 1 mg de protéines à digérer) pendant une nuit à 37°C. L'échantillon est soumis à une incubation à 100°C pendant 5 min pour dénaturer la trypsine et la chymotrypsine. Les peptides libérés sont digérés par la PNGaseF (Unité/Matière), dans le même tampon que la chymotrypsine, pendant une nuit à 37°C. Les N-glycannes et O-glycopeptides sont séparés sur une colonne de C18 (Sep Pack, Water®) ; les N-glycannes sont élués directement avec l'acide acétique à 5% dans l'eau et les O-glycopeptides sont ensuite élués avec de l'acide acétique à 5% dans du propanol/eau (40/60, v/v). Les O-glycannes du mélange peptides et O-glycopeptide sont libérés par β-élimination. Les O- et N-glycannes (5%) sont perméthylés avant d'être analysés par spectrométrie de masse.

A9 - La perméthylation :

Les échantillons déshydratés et placés sous argon sont repris dans 400 µL de DMSO anhydre, 200 µL d'iodure de méthane (ICH₃) et 50 mg de Soude (NaOH) sont ajoutés au

mélange. Après une incubation de 2 h au bain à ultrasons, la réaction est arrêtée par addition de 1 mL d'eau et les composés perméthylés sont extraits par 1 mL de chloroforme. La phase chloroformique est lavée 5 fois par 2 mL d'eau, puis isolée et séchée sous azote afin d'être conservée à -20°C.

A10 - Dérivation au TMS :

Les glycosphingolipides déshydratés subissent une méthanolyse par ajout de 500 µL d'acide chlorhydrique à 0,5 M dans du MeOH anhydre à 80°C pendant 20 h. Les FAME (*Fatty Acid Methyl Ester*) sont isolés du méthanol par une triple extraction à l'heptane (250 µL), puis ils sont concentrés dans 100 µL et injectés en GCMS. Ensuite, la fraction méthanolique est neutralisée par du carbonate d'argent (Ag₂CO₃) jusqu'au pH 6,5, puis *N*-réacétylé par 20 µL d'anhydride acétique à température ambiante pendant une nuit. La phase liquide est extraite et séchée sous flux d'azote, puis la réaction de silylation est réalisée en ajoutant 20 µL de BSTFA (Bis Silyl Trifluoroacétamide) et 20 µL de pyridine sur l'échantillon. Après 2 h de réaction à température ambiante, les monosaccharides et les bases sphingoïdes dérivées au TMS sont analysés par chromatographie en phase gazeuse avec le programme de température approprié.

A11 - La chromatographie en phase gaz couplée à la MS (GCMS) :

La séparation GC a été réalisée sur un chromatographe en phase gazeuse Trace GC Ultra (Thermo) équipé d'une colonne non-polaire Alltech® EconoCAP™-Capillary-Column™-1 aux dimensions suivantes : 25m x 0,25mm x 0,25µm (longueur x diamètre x épaisseur de phase). La température de l'injecteur est de 280°C et les échantillons ont été analysés en utilisant différents programmes de température. La colonne a été couplée à un spectromètre de masse Finnigan Automass II. Les analyses ont été effectuées en mode d'Impact Electronique (EI) (énergie d'ionisation de 70 eV; température de la source 150°C). Les analyses qualitatives et quantitatives des données GC-MS ont été obtenues grâce au logiciel Xcalibur (Thermo-Finnigan; Les Ullis, France).

Programme température 1 : Acides Gras (FAME) :

120°C à 280°C à 5°C/min ; 10 min 280°C

Programme 2 : Monosaccharides et Bases Shingoïdes (TMS) :

120°C à 240°C à 2°C/min ; 10 min à 240°C ; 240°C à 280°C à 4°C/min ; 10 min à 280°C

A12 - Spectrométrie de Masse en MALDI-TOF et MALDI-TOF-TOF :

Les analyses ont été réalisées sur un spectromètre de masse MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation - Time-of-Flight*) Voyager Elite (DE-STR, PerSeptive Biosystem®) ou par spectrométrie 4800 MALDI-TOF-TOF AB-Sciex (Applied Biosystem®). La désorption et l'ionisation sont obtenues à l'aide d'un laser à azote pulsé (longueur d'onde : 337 nm). Les spectromètres opèrent en mode réflectron positif avec une tension d'accélération de 20 kV, le délai d'extraction étant de 200 nsec. Lors de la fragmentation, les ions moléculaires parents sont sélectionnés dans un analyseur de type temps de vol et partiellement fragmentés dans une cellule de collision (CID) avec un gaz de collision (N₂) à 5,3x10⁻⁵ Torr. L'énergie de collision est de 60 V. Classiquement, les spectres sont acquis par accumulation de 300 tirs lasers. Les échantillons perméthylés ou les analogues glycaniques sont dissous respectivement dans du méthanol/eau (80:20 ; v/v) ou du méthanol, à une concentration de 5 à 10 pmoles/μL. 1 μL d'échantillon est mélangé à 1 μL de matrice DHB (acide 2,5 dihydroxy-benzoïque) à 10 mg/mL dans une solution de méthanol/eau (80:20 ; v/v) directement sur la cible MALDI.

A13 - Identification et quantification de l'acide sialique par HPLC :

Nous avons travaillé avec une Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC) de type Variant ProStar équipée d'une colonne C18 (Phenomenex Gemini 5μ 110A 250 x 4,60 mm) de phase inverse couplée à un détecteur de fluorescence avec une longueur d'onde d'excitation de 373 nm et une longueur d'onde d'émission de 448 nm. Les échantillons glycaniques lyophilisés ont subi une hydrolyse acide avec 0,1M de TFA à 80°C pendant 2h. Suite à cette première étape visant à libérer l'acide sialique, les échantillons sont lyophilisés avant de réaliser la dérivation au DMB qui réagit avec les acides α-cétonique. Pour réaliser la dérivation au DMB, une solution de 20 μL d'acide trifluoroacétique à 0,01 M et une solution réactionnelle de 20 μL [β-mercaptoéthanol 1 M ; Na₂S₂O₄ 0,018 M ; TFA à 20 ; DMB à 1,6 mg/mL] sont ajoutées à l'échantillon et placées à 50°C pendant 2h dans l'obscurité. La réaction est injectée en HPLC et l'élution s'effectue en 30 minutes grâce aux 2 solvants suivant : le A de Acétonitrile/Méthanol/eau (11:13:87 ; v/v/v) et le B (acétonitrile). Le programme analytique utilisé est : 100% de A entre 0 et 16 minutes ; 50% de A et B entre 16 et 21 minutes ; et 100% de B entre 21 à 30 minutes.

Les fractions cellulaires des glycoprotéines, des glycosphingolipides et du cytosol ont été séparées des fibroblastes primaires de peau pour quantifier les niveaux d'incorporation du SiaNAI. Les cellules ont été cultivées dans des flacons de culture de 75 cm² et cultivées dans un milieu supplémenté ou non par 500 μM de SiaNAI pendant 72h. Les cellules ont ensuite été lavées au PBS (3,2 mM Na₂HPO₄, 0,5 mM KH₂PO₄, 1,3 mM KCl, 135 mM NaCl, pH 7,4) et décollées physiquement par un râteau. Les cellules collectées ont été centrifugées à 3000 rpm afin de retirer le maximum de PBS et séchées par lyophilisation. Les cellules sont

réhydratés séquentiellement par trois volumes d'eau dé-ionisée (500 µL) qui seront séparés du culot et mélangés. Cette phase aqueuse contient des protéines solubles et des acides sialiques libres, elle a été séchée et reprise dans un mélange à -20°C d'acétone/eau (80/20 ; v/v) pendant une nuit et centrifugée à 13400 rpm pour isoler les protéines solubles précipitées. Les acides sialiques libres représentent la fraction cytosolique et les protéines solubles précipitées ont été mélangées aux protéines membranaires. Le culot cellulaire de départ contient les glycoprotéines membranaires et des glycolipides. Il a été suspendu dans du MeOH/CHCl₃/eau (6:2:4 ; v/v/v) et centrifugé à 13400 rpm afin précipiter les protéines membranaires et solubiliser les glycolipides. La fraction soluble supérieure aqueuse a été isolée et 400 µL de méthanol ont été ajoutés, puis le mélange a été centrifugé à 13400 rpm. Les phases solubles ont été mélangées et séchées, elles contiennent la fraction des glycolipides alors que la phase solide contient les protéines membranaires. L'ensemble des fractions de glycoprotéines, de glycolipides et du cytosol a été lyophilisé et dérivé au DMB.

A14 - Biologie moléculaire :

Les Kits Nucleospin RNA-II ont été achetés à Macherey-Nagel (Hoerdts, France). Les oligonucléotides ont été synthétisés et purifiés par Eurogentec (Herstal, Belgique). Les kits de la ADN Taq polymérase ont été achetés à Qiagen (Courtaboeuf, France) et le vecteur pCR2.1-TOPO a été acheté à TOPO TA (Cloning de Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Le kit de de synthèse d'ADNc par Q-PCR de AffinityScript et le kit d'ARN 6000 *Nano LabChip et Bioanalyzer* sont de Stratagene (Agilent technologies, La Jolla, CA). Le spectrophotomètre visible est un NanoDrop ND-1000 (technologies NanoDrop, Wilmington, DE).

Les ARN totaux ont été récupérés des organes en utilisant le kit ARN-II ARNm Nucleospin. Les ARN ont été quantifiés à l'aide d'un spectrophotomètre visible ND-1000 NanoDrop. L'intégrité de l'ARN a été évalué en utilisant le Kit ARN 6000 Nano LabChip sur un *Bioanalyzer Agilent*. Le premier brin d'ADNc a été synthétisé à partir d'ARN total en utilisant une amorce oligo (dT) et le kit de synthèse d'ADNc AffinityScript par Q-PCR selon le protocole du fabricant. Sur la base des séquences d'acides nucléiques déterminées *in silico*, les amorces oligonucléotidiques ont été conçues dans le cadre de lecture ouvert des sialyltransférases, fucosyltransférases, *CMAH*, *CMAS1* et *CMAS2* ([Schaper, Bentrop et al. 2012](#)). Les séquences nucléotidiques des amorces utilisées sont disponibles dans l'article des cellules ZFL. Seules les séquences des amorces ciblant les gènes *CMAS1*, *CMAS2* et *CMAH* ne sont pas publiées et ont été ajoutés à la fin du paragraphe. Les amplifications PCR ont été réalisées sur 35 cycles avec le kit Core ADN Taq polymérase avec des solutions tampon fournies par le fabricant. Les températures d'hybridation ont variées de 50 à 67°C et fragments amplifiés ont été soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose (1,5%), et visualisés par le bromure d'éthidium. Les séquences nucléotidiques ont été confirmées par séquençage (Genoscreen, Lille, France).

Gènes	Amorses Sens	Amorses Anti-Sens	T° Hybr	Taille Amp
CMAH	ACC-CGT-GGC-TCA-CAG-GAC-CA	CTG-CCA-CAC-ACC-GAA-CGG-CA	66°C	275 pb
CMAS1	CGC-GGC-GTC-AGG-ACT-GGA-GTG	GGA-CAG-CCC-ATC-CTC-TCA-GAC-AGT	56°C	427 pb
CMAS2	TCC-GAC-TGC-GAC-CCG-AGG-TG	AGG-CGA-TCC-TGC-CCA-GCT-CA	67°C	321 pb

A15 Les anticorps :

Les anticorps ciblant les motifs KDN α 2-3Gal et KDN α 2-8KDN ont été respectivement produits et caractérisés ([Song, Kitajima et al. 1993](#)) et ([Kanamori, Inoue et al. 1994](#)). Ces anticorps ont été utilisés pour marquer les structures à KDN lors des expériences de WB et de microscopie sur les coupes en paraffine des organes du poisson zèbre adulte. Nous remercions le Pr Ken Kitajima pour ces expériences.

B / Synthèse Chimiques :

B1 - La synthèse chimique :

Tous les produits chimiques ont été achetés en qualité analytique et utilisés sans purification supplémentaire. Les sucres-alcynes (ManNAI, SiaNAI, GalNAI et GlcNAI) ont été synthétisés et peracétylés selon les procédures communiquées par ([Chang, Chen et al. 2009](#)). La Biotine-Azide et le BTTAA ont été synthétisés respectivement en accord avec les protocoles de ([Hsu, Hanson et al. 2007](#)) et ([Besanceney-Webler, Jiang et al. 2011](#)). Les spectres RMN protons et carbones ont été enregistrés sur un spectromètre BRUKER AVANCE 400MHz en utilisant D₂O comme solvant (1H 400MHz ; 13C 100MHz). Les déplacements chimiques (en ppm) ont été déterminés par rapport au tétraméthylsilane (0 ppm). Les spectres de masse ont été acquis sur un spectromètre de masse Elite Voyager DE-STR (Perspective Biosystems, Framingham, MA) en mode réflectron positif. Les échantillons ont été préparés en mélangeant directement sur la cible 1 μ L de solution de produit (1-5 pmol) avec 1 μ L de solution de matrice de 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB) à 10 mg/mL dans CH₃OH/H₂O (50/50, v/v).

Synthèse de la N-4-Pentynoïlmannosamine (ManNAI - mixture d'anomères) :

Un mélange de D-mannosamine chlorhydrate (4,0 mmol), d'ester de N-succinimide-4-pentynoate 9 (4,0 mmol) et de triéthylamine (12,0 mmol) dans du DMF (20 ml) a été agité à température ambiante pendant une nuit. Le mélange réactionnel a été concentré sous vide et le résidu a été purifié par chromatographie-*flash* sur colonne (CHCl₃/MeOH 8:1) pour donner le N-4-Pentynoïlmannosamine (87%); 1H-RMN (500 MHz, D₂O) d 2,37 (t, 2.63H, J=2,5Hz), de 2,48 à 2,63 (m, 10.5H), de 3,38 à 3,42 (m, 1H), 3,52 (t, 1H, J=10Hz), 3,63 (t,

1.63H, J=10Hz), de 3,69 à 3,91 (m, 7.89H), 4,05 (dd, 1.63H, J=4,5 et 10Hz), 4,35 (dd, 1.63H, J=1,5 et 4,5Hz), 4,47 (dd, 1H, J=1,5 et 4,5Hz), 5,03 (d, 1H, J=1,5Hz), 5,13 (d, 1.63H, J=1,5Hz); ¹³C-RMN (125 MHz, D₂O) δ 14.78, 14.91, 34.62, 34.79, 53.67, 54.50, 60.91, 60.93, 67.01, 67.28, 69.25, 70.56, 70.71, 72.47, 72.50, 76.80, 84.04, 84.45, 93.36, 93.67, 175.68, 176.41, ESI-TOF-HRMS (M+H)⁺ (C₁₁H₁₇NO₆) : 260.11 m/z.

Synthèse de l'acide N-4-pentynoïque neuraminique (SiaNAI - anomère α) :

Un mélange de ManNAI (290 mg) est dissout dans 11 mL de phosphate de potassium (50 mM et pH 7,4) suivi de l'addition de pyruvate de sodium (1,2 g), d'azide de sodium à 1% (w/v) et de la Neu5Ac Aldolase (25 U - Sigma). Ce mélange réactionnel est mis à agiter à 37°C pendant 14 heures, puis des spectres RMN proton (1D) sont enregistrés pour déterminer l'état d'avancement de la réaction. Lorsque celle-ci est complète, le mélange réactionnel est séché et repris dans 2 mL d'eau pour être purifié sur une chromatographie d'échange d'anion de type Dowex AG1-X2 (forme formiate - BIO-RAD - 200-400 mesh) dans un gradient d'acide formique de 1,0 M à 2,5 M à un débit de 1 mL/min. L'identification du produit est réalisée sur silice par une révélation au résorcinol. Les fractions contenant le produit final sont réunies, séchées et analysées en RMN ; ¹RMN (500MHz, D₂O), δ 1.87 (dd, J=13.0, 11.5Hz), 2.31 (dd, J=13.0, 5.0Hz, 1H), 2.39 (br, 1H), 2.50 (m, 4H), 3.59 (dd, J=12.0, 6.5Hz, 1H), 3.66 (dd, J=9.0, 1.0Hz, 1H), 3.75 (m, 1H), 3.83 (dd, J=12.0, 3.0Hz, 1H), 3.96 (app t, J=10.3Hz, 1H), 4.7 (m, 2H). ¹³RMN (75 MHz H₂O) δ 14.5, 34.7, 52.0, 63.2, 66.6, 68.3, 70.2, 70.3, 70.4, 83.5, 95.3, 173.4 et 175.4. ESI-TOF HRMS (M + H)⁺ (C₁₄H₂₂NO₉) : 348.13 m/z.

Synthèse de la 3-azidopropyl-biotine amide (ou biotine-azide) :

Un mélange d'azide de sodium (1,95 g) et de 3-chloropropylamine hydrochloride (1,95 g – Alpha Aesar) dans 8 mL d'H₂O est agité sous une colonne à condensation hydraulique, à 77°C, pendant 96 heures. Le mélange réactionnel est ajusté à pH 11-12 par ajout de NaOH (soude). Le précipité de chlorure de sodium est éliminé par filtration. Une solution de diéthyl-éther (5 x 2 mL) est utilisée pour extraire le 1-azido-3-aminopropane de la phase aqueuse. Cette fraction organique est ensuite séchée par ajout de MgSO₄ (sulfate de magnésium), évaporée et testée par RMN.

Un mélange de D-(+)-biotine (0,41 mmol), de 1-azido-3-aminopropane (0,82 mmol), O-(benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tétraméthyluronium hexafluorophosphate (0,82 mmol), et de N,N-diisopropyléthylamine (0,82 mmol) dans du DMF (5 ml) a été agité à température ambiante pendant 2h. Le mélange réactionnel a été concentré sous vide et le résidu a été purifié par chromatographie-*flash* sur colonne de silice (CHCl₃/MeOH 10:1) pour donner la 3-azidopropyl-biotine amide (40%); ¹H-RMN (400 MHz, DMSO -d₆) δ 1,21 à 1,35 (m, 4H), de 1,45 à 1,55 (m, 3H), de 1,60 à 1,67 (m, 3H), 2,05 (t, 2H, J=7,6Hz), 2,57 (d, 1H, J=12,6Hz), 2,82 (dd, 1H, J=4,8 et 12,6Hz), 03.07 à 03.10 (m, 3H), 04.10 à 04.14 (m, 1H), de 4,28 à 4,32 (m, 1H), 6,36 (s, 1H), 6,42 (s, 1H), 7,84 (m, 1H); ESI-TOF-HRMS (M+H)⁺ (C₁₃H₂₃N₆O₂S) : 327,16 m/z.

Synthesis of 2-(4-((bis((1-tert-butyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)amino)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)acetic acid (BTAA) :

Une solution d'acide sulfurique (6,17 M ; 148 mL) est préparée et refroidie, puis l'azide de sodium (11,6 g, 0,18 mol) est dissous à 4°C dans la solution sous agitation. Ensuite, le tert-butyl-alcool est ajouté (12g ; 15,5 ml ; 0,16 mol) et la réaction est laissée à RT pendant 18h. Le t-butyl-azide est récupéré dans la phase organique et lavé par 50 ml de soude (2M) dans le but de supprimer toute trace d'ammoniac. Le produit est ensuite séché sur sulfate de magnésium pour enfin obtenir 11,14g de produit soit un rendement de 80%. RMN 1H ; CDCl₃ (300 MHz) δ (ppm) 1,245 (s, 9H).

Le 3,3-diéthoxy-1-propyne (2,69 g ; 20,4 mmol) et le tert-butyl azide (2,68 g ; 27 mmol) sont ajoutés dans un mélange de tert-butanol/eau (1:1 ; v/v ; 20mL). Du NaHCO₃ (2,8g ; 33,4 mmol), du CuSO₄·5H₂O (0,286 g, 1,14 mmol) et de l'ascorbate de sodium (0,94 g ; 4,7 mmol) sont ajoutés au mélange sous agitation à RT pendant 16h. Le produit d'intérêt est repéré sur CCM grâce à une coloration au permanganate de potassium. Enfin de l'EDTA (2 ml ; 0,5 M ; pH=8) et de l'acétate d'éthyle (90 ml) sont ajoutés à la fraction d'intérêt qui est lavée par : une solution saturée en NaHCO₃ (2 x 50 mL) ; de l'eau (2 x 10 ml) et une solution saturée en NaCl (30 ml). Les phases organiques combinées sont séchées sur sulfate de magnésium, filtrées et concentrées pour fournir 3,9 g de produit (R= 83 %). RMN 1H ; CDCl₃ (300 MHz) δ (ppm) 7.63 (s, 1H); 5.69 (s, 1H); 3.76-3.55 (m, 4H); 1.65 (s, 9H); 1.23 (t, J = 7.0 Hz, 6H) RMN 13C; CDCl₃ (300 MHz) δ (ppm) 146.5, 118.9, 97.2, 61.9, 59.4, 30.1, 15.2

Le 1-tert-butyl-4-(diéthoxyméthyl)-1H-1,2,3-triazole (1,33 g ; 5,84 mmol) est ajouté dans 6 mL de dichlorométhane, suivi par l'addition d'eau (3 mL) et de TFA (1 mL). La réaction est placée sous agitation durant 3h à RT. Ensuite, le mélange réactionnel est dilué dans 100 mL d'acétate d'éthyle et lavé avec des solutions aqueuses saturées en NaHCO₃ (3x40 mL) et en NaCl (40 mL). Les phases organiques combinées sont séchées sur sulfate de magnésium, filtrées et concentrées pour donner 681 mg de produit (R=76 %). RMN 1H ; CDCl₃ (300 MHz) δ (ppm) 1,64 (s, 9H) ; 8,32 (s, 1H), 10,01 (s, 1H)

Du 1-tert-butyl-1H-1,2,3-triazole-4-carbaldéhyde (681 mg ; 4,43 mmol) est dissous dans du dichlorométhane (23 mL ; 0,2 M). Puis, de la propargyle amine (99 mg ; 7,2 mmol) et du triacétoxyborohydrure de sodium (1,04g ; 4,9 mmol) sont ajoutés au mélange sous agitation à RT pendant 40h. Ensuite, une solution d'acide sulfurique (24 mL ; 1M) est ajoutée à la réaction sous agitation pendant 15 min. Le mélange est ajusté à un pH de 10 par l'ajout de carbonate de potassium. Le BTAA est récupéré par une extraction de phase eau/dichlorométhane et les phases organiques sont combinées, séchées sur sulfate de magnésium, filtrées et concentrées. La fraction isolée est alors purifiée sur chromatographie-flash (éther de pétrole/acétate d'éthyle 20:80) et la détection est réalisée sur silice grâce à la coloration du permanganate de magnésium. Le produit est le N,N-bis((1-tert-butyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)prop-2-yn-1-amine et a été obtenu avec 84% de rendement.

Du N,N-bis((1-tert-butyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)méthyl)prop-2-yn-1-amine (1,0 g ; 0,30 mmol) et du 2-azido-acetic acid (0,45 g ; 0,45 mmol) ont été dissous dans 30 mL de THF. Puis,

la N,N'-diisopropyléthylamine (0,62 g ; 0,48 mmol) et le tris(triphénylphosphine) copper (I) bromide (0,28 g ; 0,03 mmol) sont ajoutés. Le mélange réactionnel sous argon est agité vigoureusement à 60°C pendant une nuit. De l'eau (20 mL) et du CupriSorb™ (2g) sont ajoutés au mélange sous agitation pendant 30 min et celles-ci est filtrée. le produit brut est concentré sous vide et purifié par chromatographi-flash sur silice (40 % de MeOH dans EtOAc avec 1% d'acide acétique) pour fournir un solide blanc avec un rendement: 75 %. ¹H RMN (600 MHz, D₂O) δ 8.00 (s, 2H), 7,92 (s, 1H), 5,05 (s , 2H), 3,92 (s, 2H), 3,90 (s, 4H), 1,65 (s, 18H) ; ¹³C RMN (150 MHz, D₂O) δ 173.2, 143.0, 142.6, 126.3 , 122.8, 60.3, 53.1, 48.0, 47.9, 28.9. HRMS (M + H)⁺ C₁₉H₃₀N₁₀O₂ : 431.26 m/z.

B2 - La culture cellulaire :

Les cellules cancéreuses du sein MCF-7 proviennent de l'ATCC (American Type Culture Collection) et ont été cultivées dans du milieu *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal (Lonza), 2 mM de L-gluthamine et 100 U/mL de Pénicilline et 0.1 mg/mL de Streptomycine. Les cellules MCF-7 ont été cultivées à 37°C dans une atmosphère humide saturée à 5% de CO₂. Pour les analyses de microscopie, les cellules MCF-7 ont été cultivées dans des boîtes de 6 puits sur des lamelles microscopiques. Le milieu de culture des cellules MCF-7 a été supplémenté ou non par 500 µM de sucres-alcynes dans leurs versions acétylées et non-acétylées durant 48h. Les cellules MCF-7 ont ensuite été fixées au PAF à 4 % et ont été marquées suivant la procédure décrite dans la partie C4.

C / Régulation de la Sialylation :

C1 - La culture cellulaire :

Les fibroblastes cutanés primaires ont été maintenues dans du milieu *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal (Lonza), à 37°C dans une atmosphère humide saturé à 5% de CO₂. Le patient PMM2-CDG (CDG-Ia) était hétérozygote pour les mutations c.422G>A, p.R141H; c.357C>A, p.F119L du gène de la phosphomannomutase-2 (PMM2). Le patient ALG11 -CDG (CDG- Ip) était homozygote pour la mutation faux-sens c.479G>T, p.G160V dans le gène ALG11. Le patient COG5-CDG était homozygote pour une mutation non-sens dans le gène COG5 (c.2518G > T; p.E840X). Le patient COG7-CDG était homozygote pour la mutation IVS1+4 A>C. Le patient MAN1B1-CDG était homozygote pour la mutation faux-sens p.R334C (non publiée). Les trois patients TMEM165-CDG sont homozygotes pour la mutation d'épissage c792+182G>A (TMEM165-P1), homozygotes pour (c.377G >A; p.R126H) (TMEM165-P2) et hétérozygotes composites

pour la c.376C> T; p.R126C and c.910G > A; p.G304R (TMEM165-P3) respectivement. Le patient ATP6V0A2-CDG était homozygote pour la mutation de c.1324G4T, p.E442X. Le patient CDG-IIx a présenté une grave anomalie du profil de la N-glycosylation glycosylation golgien lors d'une analyse par spectrométrie de masse.

Les cellules HFF proviennent de l'ATCC (CRL-1635) et ont été cultivées dans du milieu *Dulbecco's modified Eagle's medium* (Gibco BRL) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (Gibco), 2 mM de L-glutamine et 100 U/mL de Penicilline et 0.1 mg/mL de Streptomycine. Les cellules MCF-7 ont été cultivées à 37°C dans une atmosphère humide saturée à 5% de CO₂. Les parasites (5×10^7) ont été ajoutés sur les cellules HFF confluentes dans un flacon de culture de 75 cm² pendant 72h. Les parasites ont été récupérés et libérés en utilisant un Homogenizer Mixer Mill (Retsch). La suspension a été passée sur une colonne de 20 mL de laine de verre pour éliminer les débris cellulaires. La pureté de la suspension des tachyzoïtes a été observée par microscopie. Des tests ont également été effectués pour tester la contamination des cellules HFF et des parasites par les mycoplasmes. Les analyses individuelles des GSL des cellules HFF et des parasites ont été réalisées (cf. A3 et A4). Les observations microscopiques ont été réalisées grâce à une co-infection avec les parasites (5×10^7) et une co-incubation des cellules HFF avec 500 µM de SiaNAI durant 48h. Les cellules ont ensuite été fixées au PAF 4% et les marquages chimiques ont pu être réalisés (cf. C3).

C2 Les anticorps :

Les anticorps Anti-TMEM165 proviennent de Sigma- Aldrich (St Louis, MO, USA). Les anticorps anti-TGN46 et anti-EEA1 proviennent de BD Biosciences (Franklin Lakes, New Jersey, USA).

C3 Le marquage métabolique des sucres-alcynes :

Les cellules d'intérêts ont été cultivées pendant une nuit sur des lamelles en verre (diamètre 12mm). Le milieu a ensuite été changé par un milieu contenant 500 µM de sucres-alcynes modifiés. L'incorporation a été arrêtée aux temps mentionnés par un lavage des cellules au PBS et une fixation des cellules au paraformaldéhyde 4% (PAF) ou au méthanol à -20°C. Dans le cas de la fixation au PAF, les cellules ont été perméabilisées dans du Triton X-100 à 0,5% pendant 10 min. Suite à la fixation, les cellules ont été lavées au PBS et incubées pendant 15 min à température ambiante dans l'obscurité avec un tampon « *click-chemistry* » [CuSO₄ pentahydrate 50 µM ; KH₂PO₄ 100 mM ; BTAA 300 µM ; Ascorbate de sodium 2,5 mM ; Azide-fluor 545 à 10 µM (Sigma-Aldrich) dans de l'eau déionisée]. Les cellules ont ensuite été lavées 3 fois au PBS et ont pu subir différents marquages supplémentaires (DAPI/Immunomarquage). Pour le DAPI (*4',6-Diamino-2-Phenylindole, Dihydrochloride*), les cellules ont été placées dans une solution de DAPI à 300 nM dans du PBS à température

ambiante dans l'obscurité pendant 10 min. Pour l'immunomarquage, les cellules ont été placées dans un tampon de blocage [0,2% de gélatine, 1% de BSA et 2% de sérum de chèvre normal (Invitrogen) dans PBS]. Les cellules fixées ont été incubées à température ambiante pendant 1h avec l'anticorps primaire dilué au 1:100 dans le tampon de blocage. Après lavage au PBS, les cellules ont été incubées pendant 1h avec les anticorps secondaires conjugués aux Alexa-488, Alexa-568 ou Alexa-700 (Molecular Probes) dilué au 1:600 dans le tampon de blocage. Immunoloration fluorescentes des protéines ont été détectées grâce au microscope confocal inverse (Leica TCS SP5). Les photos ont été prises à l'aide du logiciel Leica Application Suite avancée Fluorescence (LAS-AF) (Leica Microsystems Wetzlar, Allemagne). Pour garantir une juste comparaison, chaque photo a été prise dans les mêmes paramètres d'acquisitions. Pour la quantification des intensités de fluorescence golgienne, nous avons utilisé le TCS SP5 qui est un outil d'analyse du tracé de l'intensité (Leica) qui fournit des intensités relatives de fluorescence dans les différents canaux de collecte sur une région d'intérêt (ROI). Le domaine de l'intensité de fluorescence dans une région d'intérêts (ROI) correspond à la région du Golgi qui a été délimité pour chaque cellule. Ces analyses ont été réalisées sur trois domaines différents de deux expériences indépendantes ; Ce qui représente un total d'environ 100 cellules pour la quantification de l'intensité de fluorescence par microscopie. L'AF photos LAS a ensuite était exportée au format TIFF et traitées avec Adobe Photoshop 7.0.

C4 Les souris Balb/C et le parasite *Trypanosoma cruzi* :

Les souris Balb/C (WT) ont été infectées par une injection intrapéritonéale d'une culture métacyclique de trypomastigotes (2.10^4) de *T. cruzi* d'une souche Brésilienne. Les prélèvements rétrobulbaire de sang ont été effectués sur les souris au temps NI, 7DPI, 14DPI, 21DPI et 28DPI sur les souris afin de récupérer 200 μ L de sérum. Les procédures en vigueur du cadre éthique ont été respectées pour la manipulation des souris. La purification des Ng a ensuite été effectuée comme décrit dans la partie A8.

C5 Quantification des acides sialiques et des protéines.

La quantification de l'acide sialique a été réalisée directement sur les *N*-glycannes purifiés (cf. A5) et le dosage de l'acide sialique a été réalisé par une dérivation au DMB par HPLC (cf. A13). Le dosage des protéines a été réalisé par un kit BCA de dosage des protéines en microplaque (PIERCE). La lecture des densités optiques a été réalisée sur un système automatisé et la quantification a été reportée grâce à une gamme étalon de BSA (Serum Albumine Bovine).

C6 SDS-PAGE :

Les échantillons de protéines sériques des souris ont migrés sur un gel d'électrophorèse SDS-PAGE à 10% ou à 15%. Le témoin de masse *Precision Plus Protein Standards* BIO-RAD a été utilisé pour le repère des masses. La révélation des gels a été effectuée au bleu de *Coomassie* en utilisant une solution commercial de *l'Instant Blue*.

Références

Références

A

- Agard, N. J., J. A. Prescher, et al. (2004). "A strain-promoted [3 + 2] azide-alkyne cycloaddition for covalent modification of biomolecules in living systems." J Am Chem Soc **126**(46): 15046-15047.
- Alcantara-Neves, N. M. and L. C. Pontes-de-Carvalho (1995). "Circulating trans-sialidase activity and trans-sialidase-inhibiting antibodies in Trypanosoma cruzi-infected mice." Parasitol Res **81**(7): 560-564.
- Anderson, C. T., I. S. Wallace, et al. (2012). "Metabolic click-labeling with a fucose analog reveals pectin delivery, architecture, and dynamics in Arabidopsis cell walls." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(4): 1329-1334.
- Aoki, K., M. Porterfield, et al. (2008). "The diversity of O-linked glycans expressed during Drosophila melanogaster development reflects stage- and tissue-specific requirements for cell signaling." J Biol Chem **283**(44): 30385-30400.
- Apweiler, R., H. Hermjakob, et al. (1999). "On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database." Biochim Biophys Acta **1473**(1): 4-8.
- Ashwell, G. and A. G. Morell (1974). "The role of surface carbohydrates in the hepatic recognition and transport of circulating glycoproteins." Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol **41**(0): 99-128.
- Avsar-Ban, E., H. Ishikawa, et al. (2010). "Protein O-mannosylation is necessary for normal embryonic development in zebrafish." Glycobiology **20**(9): 1089-1102.

B

- Bai, Q. and E. A. Burton (2011). "Zebrafish models of Tauopathy." Biochim Biophys Acta **1812**(3): 353-363.
- Bakkers, J., C. E. Semino, et al. (1997). "An important developmental role for oligosaccharides during early embryogenesis of cyprinid fish." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(15): 7982-7986.
- Banerjee, P. S., P. Ostapchuk, et al. (2011). "Unnatural amino acid incorporation onto adenoviral (Ad) coat proteins facilitates chemoselective modification and retargeting of Ad type 5 vectors." J Virol **85**(15): 7546-7554.
- Bardor, M., D. H. Nguyen, et al. (2005). "Mechanism of uptake and incorporation of the non-human sialic acid N-glycolylneuraminic acid into human cells." J Biol Chem **280**(6): 4228-4237.
- Barras, A., F. A. Martin, et al. (2013). "Glycan-functionalized diamond nanoparticles as potent E. coli anti-adhesives." Nanoscale **5**(6): 2307-2316.
- Baskin, J. M., K. W. Dehnert, et al. (2010). "Visualizing enveloping layer glycans during zebrafish early embryogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(23): 10360-10365.
- Bedell, V. M., Y. Wang, et al. (2012). "In vivo genome editing using a high-efficiency TALEN system." Nature **491**(7422): 114-118.
- Bennett, E. P., U. Mandel, et al. (2012). "Control of mucin-type O-glycosylation: a classification of the polypeptide GalNAc-transferase gene family." Glycobiology **22**(6): 736-756.
- Bentrop, J., M. Marx, et al. (2008). "Molecular evolution and expression of zebrafish St8SialIII, an alpha-2,8-sialyltransferase involved in myotome development." Dev Dyn **237**(3): 808-818.

- Berger, J. and P. D. Currie (2012). "Zebrafish models flex their muscles to shed light on muscular dystrophies." Dis Model Mech **5**(6): 726-732.
- Besanceney-Webler, C., H. Jiang, et al. (2011). "Increasing the efficacy of bioorthogonal click reactions for bioconjugation: a comparative study." Angew Chem Int Ed Engl **50**(35): 8051-8056.
- Bill, B. R., A. M. Petzold, et al. (2009). "A primer for morpholino use in zebrafish." Zebrafish **6**(1): 69-77.
- Bishop, J. R. and P. Gagneux (2007). "Evolution of carbohydrate antigens--microbial forces shaping host glycomes?" Glycobiology **17**(5): 23R-34R.
- Boggs, J. M., W. Gao, et al. (2008). "Signal transduction pathways involved in interaction of galactosylceramide/sulfatide-containing liposomes with cultured oligodendrocytes and requirement for myelin basic protein and glycosphingolipids." J Neurosci Res **86**(7): 1448-1458.
- Boyce, M. and C. R. Bertozzi (2011). "Bringing chemistry to life." Nat Methods **8**(8): 638-642.
- Breidenbach, M. A., J. E. Gallagher, et al. (2010). "Targeted metabolic labeling of yeast N-glycans with unnatural sugars." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(9): 3988-3993.
- Burda, P. and M. Aebi (1999). "The dolichol pathway of N-linked glycosylation." Biochim Biophys Acta **1426**(2): 239-257.

C

- Castilho, A., L. Neumann, et al. (2012). "Engineering of sialylated mucin-type O-glycosylation in plants." J Biol Chem **287**(43): 36518-36526.
- Chang, A., S. Singh, et al. (2011). "Glycosyltransferase structural biology and its role in the design of catalysts for glycosylation." Curr Opin Biotechnol **22**(6): 800-808.
- Chang, L. Y., A. Harduin-Lepers, et al. (2009). "Developmental regulation of oligosialylation in zebrafish." Glycoconj J **26**(3): 247-261.
- Chang, L. Y., A. M. Mir, et al. (2009). "Molecular cloning and characterization of the expression pattern of the zebrafish alpha2, 8-sialyltransferases (ST8Sia) in the developing nervous system." Glycoconj J **26**(3): 263-275.
- Chang, P. V., X. Chen, et al. (2009). "Metabolic labeling of sialic acids in living animals with alkynyl sugars." Angew Chem Int Ed Engl **48**(22): 4030-4033.
- Chaudhary, K., J. A. Darling, et al. (2004). "Purine salvage pathways in the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*." J Biol Chem **279**(30): 31221-31227.
- Chefetz, I. and E. Sprecher (2009). "Familial tumoral calcinosis and the role of O-glycosylation in the maintenance of phosphate homeostasis." Biochim Biophys Acta **1792**(9): 847-852.
- Chen, C. S., M. C. Patterson, et al. (1999). "Broad screening test for sphingolipid-storage diseases." Lancet **354**(9182): 901-905.
- Chen, W., U. M. Unligil, et al. (2001). "Independent Lec1A CHO glycosylation mutants arise from point mutations in N-acetylglucosaminyltransferase I that reduce affinity for both substrates. Molecular consequences based on the crystal structure of GlcNAc-TI." Biochemistry **40**(30): 8765-8772.
- Chester, M. A. (1998). "IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Nomenclature of glycolipids--recommendations 1997." Eur J Biochem **257**(2): 293-298.
- Chico, T. J., P. W. Ingham, et al. (2008). "Modeling cardiovascular disease in the zebrafish." Trends Cardiovasc Med **18**(4): 150-155.
- Chimelli, L. and F. Scaravilli (1997). "Trypanosomiasis." Brain Pathol **7**(1): 599-611.
- Chisada, S., Y. Yoshimura, et al. (2009). "Zebrafish and mouse alpha2,3-sialyltransferases responsible for synthesizing GM4 ganglioside." J Biol Chem **284**(44): 30534-30546.

- Chu, J., A. Mir, et al. (2013). "A zebrafish model of congenital disorders of glycosylation with phosphomannose isomerase deficiency reveals an early opportunity for corrective mannose supplementation." Dis Model Mech **6**(1): 95-105.
- Cline, A., N. Gao, et al. (2012). "A zebrafish model of PMM2-CDG reveals altered neurogenesis and a substrate-accumulation mechanism for N-linked glycosylation deficiency." Mol Biol Cell **23**(21): 4175-4187.
- Codelli, J. A., J. M. Baskin, et al. (2008). "Second-generation difluorinated cyclooctynes for copper-free click chemistry." J Am Chem Soc **130**(34): 11486-11493.
- Coetzee, T., N. Fujita, et al. (1996). "Myelination in the absence of galactocerebroside and sulfatide: normal structure with abnormal function and regional instability." Cell **86**(2): 209-219.
- Coppens, I. (2006). "Contribution of host lipids to Toxoplasma pathogenesis." Cell Microbiol **8**(1): 1-9.
- Coppens, I. and K. A. Joiner (2001). "Parasitehost cell interactions in toxoplasmosis: new avenues for intervention?" Expert Rev Mol Med **2001**: 1-20.
- Couto, A. S., C. Caffaro, et al. (2004). "Glycosphingolipids in Plasmodium falciparum. Presence of an active glucosylceramide synthase." Eur J Biochem **271**(11): 2204-2214.
- Cummings, R. D. (2009). "The repertoire of glycan determinants in the human glycome." Mol Biosyst **5**(10): 1087-1104.
- Cylwik, B., M. Naklicki, et al. (2013). "Congenital disorders of glycosylation. Part I. Defects of protein N-glycosylation." Acta Biochim Pol **60**(2): 151-161.

D

- D'Alessio, C., J. J. Caramelo, et al. (2010). "UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase-glucosidase II, the ying-yang of the ER quality control." Semin Cell Dev Biol **21**(5): 491-499.
- Davies, L. R. and A. Varki (2013). "Why Is N-Glycolylneuraminic Acid Rare in the Vertebrate Brain?" Top Curr Chem.
- De Praeter, C. M., G. J. Gerwig, et al. (2000). "A novel disorder caused by defective biosynthesis of N-linked oligosaccharides due to glucosidase I deficiency." Am J Hum Genet **66**(6): 1744-1756.
- Debets, M. F., S. S. van Berkel, et al. (2010). "Aza-dibenzocyclooctynes for fast and efficient enzyme PEGylation via copper-free (3+2) cycloaddition." Chem Commun (Camb) **46**(1): 97-99.
- Dehnert, K. W., J. M. Baskin, et al. (2012). "Imaging the sialome during zebrafish development with copper-free click chemistry." ChemBiochem **13**(3): 353-357.
- Dehnert, K. W., B. J. Beahm, et al. (2011). "Metabolic labeling of fucosylated glycans in developing zebrafish." ACS Chem Biol **6**(6): 547-552.
- Delplace, F., E. Maes, et al. (2002). "Species specificity of O-linked carbohydrate chains of the oviducal mucins in amphibians: structural analysis of neutral oligosaccharide alditols released by reductive beta-elimination from the egg-jelly coats of Rana clamitans." Biochem J **363**(Pt 3): 457-471.
- Dennis, R. D., R. Geyer, et al. (1985). "Glycosphingolipids in insects. Chemical structures of ceramide tetra-, penta-, hexa-, and heptasaccharides from Calliphora vicina pupae (Insecta: Diptera)." J Biol Chem **260**(9): 5370-5375.
- Domon, B. and C. E. Costello (1988). "Structure elucidation of glycosphingolipids and gangliosides using high-performance tandem mass spectrometry." Biochemistry **27**(5): 1534-1543.
- Domon, C. (1988). "A systematic Nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS Spectra of Glycoconjugates." Glycoconjugates J **5**: 397-409.

- Dordal, M. S., F. F. Wang, et al. (1985). "The role of carbohydrate in erythropoietin action." Endocrinology **116**(6): 2293-2299.
- Doyon, Y., J. M. McCammon, et al. (2008). "Heritable targeted gene disruption in zebrafish using designed zinc-finger nucleases." Nat Biotechnol **26**(6): 702-708.
- Drummond, I. A. (2005). "Kidney development and disease in the zebrafish." J Am Soc Nephrol **16**(2): 299-304.
- Du, J., M. A. Meledeo, et al. (2009). "Metabolic glycoengineering: sialic acid and beyond." Glycobiology **19**(12): 1382-1401.
- Dumont, A., A. Malleron, et al. (2012). "Click-mediated labeling of bacterial membranes through metabolic modification of the lipopolysaccharide inner core." Angew Chem Int Ed Engl **51**(13): 3143-3146.

E

- Eames, B. F., A. Singer, et al. (2010). "UDP xylose synthase 1 is required for morphogenesis and histogenesis of the craniofacial skeleton." Dev Biol **341**(2): 400-415.
- Essaka, D. C., J. White, et al. (2010). "Monitoring the uptake of glycosphingolipids in Plasmodium falciparum-infected erythrocytes using both fluorescence microscopy and capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection." Anal Chem **82**(23): 9955-9958.

F

- Fahy, E., S. Subramaniam, et al. (2005). "A comprehensive classification system for lipids." J Lipid Res **46**(5): 839-861.
- Fares, F. (2006). "The role of O-linked and N-linked oligosaccharides on the structure-function of glycoprotein hormones: development of agonists and antagonists." Biochim Biophys Acta **1760**(4): 560-567.
- Feitsma, H. and E. Cuppen (2008). "Zebrafish as a cancer model." Mol Cancer Res **6**(5): 685-694.
- Finbow, M. E. and M. A. Harrison (1997). "The vacuolar H⁺-ATPase: a universal proton pump of eukaryotes." Biochem J **324** (Pt 3): 697-712.
- Flanagan-Steet, H. R. and R. Steet (2013). "'Casting' light on the role of glycosylation during embryonic development: insights from zebrafish." Glycoconj J **30**(1): 33-40.
- Flegr, J. (2013). "How and why Toxoplasma makes us crazy." Trends Parasitol **29**(4): 156-163.
- Florea, D., E. Maes, et al. (2006). "Structure elucidation of NeuAc, NeuGc and Kdn-containing O-glycans released from Triturus alpestris oviductal mucins. Characterization of the poly LacdiNAc sequence: HSO3(4)(GalNAcβ1-4GlcNAcβ1-3)1-3GalNAcβ1-4(GlcNAcβ1-3)0-1GlcNAcβ1-6GalNAc-ol." Glycoconj J **23**(5-6): 377-399.
- Foulquier, F., M. Amyere, et al. (2012). "TMEM165 deficiency causes a congenital disorder of glycosylation." Am J Hum Genet **91**(1): 15-26.
- Foulquier, F., D. Ungar, et al. (2007). "A new inborn error of glycosylation due to a Cog8 deficiency reveals a critical role for the Cog1-Cog8 interaction in COG complex formation." Hum Mol Genet **16**(7): 717-730.
- Foulquier, F., E. Vasile, et al. (2006). "Conserved oligomeric Golgi complex subunit 1 deficiency reveals a previously uncharacterized congenital disorder of glycosylation type II." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(10): 3764-3769.
- Friedrich, N., S. Matthews, et al. (2010). "Sialic acids: key determinants for invasion by the Apicomplexa." Int J Parasitol **40**(10): 1145-1154.

- Fukuda, M. (2002). "Roles of mucin-type O-glycans in cell adhesion." Biochim Biophys Acta **1573**(3): 394-405.
- Furukawa, K. and K. Takamiya (2002). "Beta1,4-N-acetylgalactosaminyltransferase--GM2/GD2 synthase: a key enzyme to control the synthesis of brain-enriched complex gangliosides." Biochim Biophys Acta **1573**(3): 356-362.

G

- Gama, C. I. and L. C. Hsieh-Wilson (2005). "Chemical approaches to deciphering the glycosaminoglycan code." Curr Opin Chem Biol **9**(6): 609-619.
- Garenaux, E., E. Maes, et al. (2011). "Structural characterization of complex O-linked glycans from insect-derived material." Carbohydr Res **346**(9): 1093-1104.
- Garenaux, E., H. Shams-Eldin, et al. (2008). "The dual origin of *Toxoplasma gondii* N-glycans." Biochemistry **47**(47): 12270-12276.
- Gauss, R., K. Kanehara, et al. (2011). "A complex of Pdi1p and the mannosidase Htm1p initiates clearance of unfolded glycoproteins from the endoplasmic reticulum." Mol Cell **42**(6): 782-793.
- Germain, D. P. (2010). "Fabry disease." Orphanet J Rare Dis **5**: 30.
- Ghosh, C., Y. L. Zhou, et al. (1994). "Derivation and characterization of a zebrafish liver cell line." Cell Biol Toxicol **10**(3): 167-176.
- Gilber, S. R., S. M. Alban, et al. (2013). "Comparison of conventional serology and PCR methods for the routine diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection." Rev Soc Bras Med Trop **46**(3): 310-315.
- Gilbert, R. G., A. C. Wu, et al. (2013). "Improving human health through understanding the complex structure of glucose polymers." Anal Bioanal Chem.
- Goreta, S. S., S. Dabelic, et al. (2012). "Insights into complexity of congenital disorders of glycosylation." Biochem Med (Zagreb) **22**(2): 156-170.
- Goto, M. (2007). "Protein O-glycosylation in fungi: diverse structures and multiple functions." Biosci Biotechnol Biochem **71**(6): 1415-1427.
- Grabowski, G. A. (2012). "Gaucher disease and other storage disorders." Hematology Am Soc Hematol Educ Program **2012**: 13-18.
- Granel, A. E., K. B. Palter, et al. (2011). "DmSAS is required for sialic acid biosynthesis in cultured *Drosophila* third instar larvae CNS neurons." ACS Chem Biol **6**(11): 1287-1295.
- Gritsman, K., J. Zhang, et al. (1999). "The EGF-CFC protein one-eyed pinhead is essential for nodal signaling." Cell **97**(1): 121-132.
- Gubbels, M. J., M. White, et al. (2008). "The cell cycle and *Toxoplasma gondii* cell division: tightly knit or loosely stitched?" Int J Parasitol **38**(12): 1343-1358.
- Guda, K., H. Moinova, et al. (2009). "Inactivating germ-line and somatic mutations in polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 12 in human colon cancers." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(31): 12921-12925.
- Guerardel, Y., L. Y. Chang, et al. (2006). "Glycomic survey mapping of zebrafish identifies unique sialylation pattern." Glycobiology **16**(3): 244-257.
- Gupta, T. and M. C. Mullins (2010). "Dissection of organs from the adult zebrafish." J Vis Exp(37).
- Guzman-Aranguez, A. and P. Argueso (2010). "Structure and biological roles of mucin-type O-glycans at the ocular surface." Ocul Surf **8**(1): 8-17.

H

- Hanada, K., K. Kumagai, et al. (2003). "Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide." Nature **426**(6968): 803-809.

- Harduin-Lepers, A., D. Petit, et al. (2008). "Evolutionary history of the alpha2,8-sialyltransferase (ST8Sia) gene family: tandem duplications in early deuterostomes explain most of the diversity found in the vertebrate ST8Sia genes." BMC Evol Biol **8**: 258.
- He, S., S. G. Krens, et al. (2011). "A DeltaRaf1-ER-inducible oncogenic zebrafish liver cell model identifies hepatocellular carcinoma signatures." J Pathol **225**(1): 19-28.
- Helenius, J., D. T. Ng, et al. (2002). "Translocation of lipid-linked oligosaccharides across the ER membrane requires Rft1 protein." Nature **415**(6870): 447-450.
- Hennet, T. (2012). "Diseases of glycosylation beyond classical congenital disorders of glycosylation." Biochim Biophys Acta **1820**(9): 1306-1317.
- Hollingsworth, M. A. and B. J. Swanson (2004). "Mucins in cancer: protection and control of the cell surface." Nat Rev Cancer **4**(1): 45-60.
- Honke, K., Y. Hirahara, et al. (2002). "Paranodal junction formation and spermatogenesis require sulfoglycolipids." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(7): 4227-4232.
- Hounsell, E. F., M. J. Davies, et al. (1996). "O-linked protein glycosylation structure and function." Glycoconj J **13**(1): 19-26.
- Hounsell, E. F., A. M. Lawson, et al. (1985). "Structural analysis of the O-glycosidically linked core-region oligosaccharides of human meconium glycoproteins which express oncofoetal antigens." Eur J Biochem **148**(2): 367-377.
- Howe, K., M. D. Clark, et al. (2013). "The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome." Nature.
- Hsu, T. L., S. R. Hanson, et al. (2007). "Alkynyl sugar analogs for the labeling and visualization of glycoconjugates in cells." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(8): 2614-2619.
- Hua, S., C. C. Nwosu, et al. (2012). "Site-specific protein glycosylation analysis with glycan isomer differentiation." Anal Bioanal Chem **403**(5): 1291-1302.
- Huisgen, R. S., G.; Moebius, L. (1967). Chem. Ber(100): 2494-2507;

I-J-K

- Inoue, S. and K. Kitajima (2006). "KDN (deaminated neuraminic acid): dreamful past and exciting future of the newest member of the sialic acid family." Glycoconj J **23**(5-6): 277-290.
- Irie, A., S. Koyama, et al. (1998). "The molecular basis for the absence of N-glycolylneuraminic acid in humans." J Biol Chem **273**(25): 15866-15871.
- Iwashkiw, J. A., N. F. Voza, et al. (2013). "Pour some sugar on it: the expanding world of bacterial protein O-linked glycosylation." Mol Microbiol **89**(1): 14-28.
- Jaeken, J. (2010). "Congenital disorders of glycosylation." Ann N Y Acad Sci **1214**: 190-198.
- Jaeken, J., T. Hennet, et al. (2009). "CDG nomenclature: time for a change!" Biochim Biophys Acta **1792**(9): 825-826.
- Jaeken, J., H. Schachter, et al. (1994). "Carbohydrate deficient glycoprotein syndrome type II: a deficiency in Golgi localised N-acetyl-glucosaminyltransferase II." Arch Dis Child **71**(2): 123-127.
- Jaeken J, V.-L. M., Snoeck L, Corbeel L, Wggermont E, Eeckels R. (1980). "Familiar psychomotor retardation with markedly fluctuating serum prolactin, FSH and GH levels, partial TBG deficiency, increased serum arylsulphatase A and increased CSF protein: a new syndrome?" J Pediatr Res **14**(179).
- Jaeken, J., H. G. van Eijk, et al. (1984). "Sialic acid-deficient serum and cerebrospinal fluid transferrin in a newly recognized genetic syndrome." Clin Chim Acta **144**(2-3): 245-247.
- Jewett, J. C., E. M. Sletten, et al. (2010). "Rapid Cu-free click chemistry with readily synthesized biarylazacyclooctynones." J Am Chem Soc **132**(11): 3688-3690.

- Jiang, H., L. Feng, et al. (2011). "Imaging glycans in zebrafish embryos by metabolic labeling and bioorthogonal click chemistry." J Vis Exp(52).
- Ju, T. and R. D. Cummings (2002). "A unique molecular chaperone Cosmc required for activity of the mammalian core 1 beta 3-galactosyltransferase." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(26): 16613-16618.
- Ju, T. and R. D. Cummings (2005). "Protein glycosylation: chaperone mutation in Tn syndrome." Nature **437**(7063): 1252.
- Kageyama, N., S. Natsuka, et al. (1999). "Molecular cloning and characterization of two zebrafish alpha(1,3)fucosyltransferase genes developmentally regulated in embryogenesis." J Biochem **125**(4): 838-845.
- Kanamori, A., S. Inoue, et al. (1994). "Monoclonal antibody specific for alpha 2-->8-linked oligo deaminated neuraminic acid (KDN) sequences in glycoproteins. Preparation and characterization of a monoclonal antibody and its application in immunohistochemistry." Histochemistry **101**(5): 333-340.
- Kanther, M., X. Sun, et al. (2011). "Microbial colonization induces dynamic temporal and spatial patterns of NF-kappaB activation in the zebrafish digestive tract." Gastroenterology **141**(1): 197-207.
- Karaoglu, D., D. J. Kelleher, et al. (2001). "Allosteric regulation provides a molecular mechanism for preferential utilization of the fully assembled dolichol-linked oligosaccharide by the yeast oligosaccharyltransferase." Biochemistry **40**(40): 12193-12206.
- Kato, K., C. Jeanneau, et al. (2006). "Polypeptide GalNAc-transferase T3 and familial tumoral calcinosis. Secretion of fibroblast growth factor 23 requires O-glycosylation." J Biol Chem **281**(27): 18370-18377.
- Katoh, T. and M. Tiemeyer (2013). "The N's and O's of Drosophila glycoprotein glycobiology." Glycoconj J **30**(1): 57-66.
- Kawashima, H. (2012). "Roles of the gel-forming MUC2 mucin and its O-glycosylation in the protection against colitis and colorectal cancer." Biol Pharm Bull **35**(10): 1637-1641.
- Kettleborough, R. N., E. M. Busch-Nentwich, et al. (2013). "A systematic genome-wide analysis of zebrafish protein-coding gene function." Nature.
- Khoo, K. H., S. Sarda, et al. (1995). "A unique multifucosylated -3GalNAc beta 1-->4GlcNAc beta 1-->3Gal alpha 1- motif constitutes the repeating unit of the complex O-glycans derived from the cercarial glycocalyx of Schistosoma mansoni." J Biol Chem **270**(29): 17114-17123.
- Kizil, C., J. Kaslin, et al. (2012). "Adult neurogenesis and brain regeneration in zebrafish." Dev Neurobiol **72**(3): 429-461.
- Kolb, H. C., M. G. Finn, et al. (2001). "Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions." Angew Chem Int Ed Engl **40**(11): 2004-2021.
- Konishi, Y. and K. F. Aoki-Kinoshita (2012). "The GlycomeAtlas tool for visualizing and querying glycome data." Bioinformatics **28**(21): 2849-2850.
- Kremser, C., A. L. Klemm, et al. (2013). "Cell-type-specific expression pattern of ceramide synthase 2 protein in mouse tissues." Histochem Cell Biol.

L

- Langhauser, M., J. Ustinova, et al. (2012). "Ncam1a and Ncam1b: two carriers of polysialic acid with different functions in the developing zebrafish nervous system." Glycobiology **22**(2): 196-209.
- Laughlin, S. T., J. M. Baskin, et al. (2008). "In vivo imaging of membrane-associated glycans in developing zebrafish." Science **320**(5876): 664-667.
- Laughlin, S. T. and C. R. Bertozzi (2009). "Imaging the glycome." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(1): 12-17.

- Lederkremer, G. Z. (2009). "Glycoprotein folding, quality control and ER-associated degradation." Curr Opin Struct Biol **19**(5): 515-523.
- Leverly, S. B. (2005). "Glycosphingolipid structural analysis and glycosphingolipidomics." Methods Enzymol **405**: 300-369.
- Li, B., F. Mock, et al. (2012). "Imaging the glycome in living systems." Methods Enzymol **505**: 401-419.
- Li, W. and Y. Ye (2008). "Polyubiquitin chains: functions, structures, and mechanisms." Cell Mol Life Sci **65**(15): 2397-2406.
- Li, Y. and X. Chen (2012). "Sialic acid metabolism and sialyltransferases: natural functions and applications." Appl Microbiol Biotechnol **94**(4): 887-905.
- Lingwood, C. A. (2011). "Glycosphingolipid functions." Cold Spring Harb Perspect Biol **3**(7).
- Liu, S. and S. D. Leach (2011). "Zebrafish models for cancer." Annu Rev Pathol **6**: 71-93.
- Lozano, M. M., Z. Liu, et al. (2013). "Colocalization of the ganglioside G(M1) and cholesterol detected by secondary ion mass spectrometry." J Am Chem Soc **135**(15): 5620-5630.
- Lu, J., T. Takahashi, et al. (2012). "Alg14 organizes the formation of a multiglycosyltransferase complex involved in initiation of lipid-linked oligosaccharide biosynthesis." Glycobiology **22**(4): 504-516.
- Lubbehusen, J., C. Thiel, et al. (2010). "Fatal outcome due to deficiency of subunit 6 of the conserved oligomeric Golgi complex leading to a new type of congenital disorders of glycosylation." Hum Mol Genet **19**(18): 3623-3633.
- Luchansky, S. J., S. Goon, et al. (2004). "Expanding the diversity of unnatural cell-surface sialic acids." Chembiochem **5**(3): 371-374.
- Lusch, A., M. Kaup, et al. (2013). "Development and Analysis of Alpha 1-Antitrypsin Neoglycoproteins: The Impact of Additional N-Glycosylation Sites on Serum Half-Life." Mol Pharm.

M

- Maccioni, H. J., R. Quiroga, et al. (2011). "Cellular and molecular biology of glycosphingolipid glycosylation." J Neurochem **117**(4): 589-602.
- Machado, F. S., L. A. Jelicks, et al. (2012). "Chagas heart disease: report on recent developments." Cardiol Rev **20**(2): 53-65.
- Maes, E., E. Garenaux, et al. (2005). "Major O-glycans from the nest of *Vespula germanica* contain phospho-ethanolamine." Carbohydr Res **340**(11): 1852-1858.
- Marshall, R. D. (1972). "Glycoproteins." Annu Rev Biochem **41**: 673-702.
- Matthews, M. and Z. M. Varga (2012). "Anesthesia and euthanasia in zebrafish." ILAR J **53**(2): 192-204.
- Mayatepek, E. and D. Kohlmuller (1998). "Mannose supplementation in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I and phosphomannomutase deficiency." Eur J Pediatr **157**(7): 605-606.
- Mayatepek, E., M. Schroder, et al. (1997). "Continuous mannose infusion in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I." Acta Paediatr **86**(10): 1138-1140.
- Merritt, E. A., S. Sarfaty, et al. (1994). "Crystal structure of cholera toxin B-pentamer bound to receptor GM1 pentasaccharide." Protein Sci **3**(2): 166-175.
- Meyer, A. and M. Schartl (1999). "Gene and genome duplications in vertebrates: the one-to-four (-to-eight in fish) rule and the evolution of novel gene functions." Curr Opin Cell Biol **11**(6): 699-704.
- Miwa, H. E., Y. Song, et al. (2012). "The bisecting GlcNAc in cell growth control and tumor progression." Glycoconj J **29**(8-9): 609-618.
- Monti, E., E. Bonten, et al. (2010). "Sialidases in vertebrates: a family of enzymes tailored for several cell functions." Adv Carbohydr Chem Biochem **64**: 403-479.
- Monti, E., A. Preti, et al. (2002). "Recent development in mammalian sialidase molecular biology." Neurochem Res **27**(7-8): 649-663.

- Montoya, J. G. and O. Liesenfeld (2004). "Toxoplasmosis." Lancet **363**(9425): 1965-1976.
- Morava, E., S. Wopereis, et al. (2005). "Defective protein glycosylation in patients with cutis laxa syndrome." Eur J Hum Genet **13**(4): 414-421.
- Moremen, K. W., M. Tiemeyer, et al. (2012). "Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function." Nat Rev Mol Cell Biol **13**(7): 448-462.
- Moriguchi, K., T. Takemoto, et al. (2007). "Free oligosaccharides with Lewis x structure expressed in the segmentation period of zebrafish embryo." J Biochem **142**(2): 213-227.
- Mullen, T. D., Y. A. Hannun, et al. (2012). "Ceramide synthases at the centre of sphingolipid metabolism and biology." Biochem J **441**(3): 789-802.
- Niimura, Y., M. Tomori, et al. (1999). "The major acidic glycolipids from the kidney of the Pacific salmon (*Oncorhynchus keta*): characterization of a novel ganglioside, fucosyl-N-acetylgalactosaminyl-GM1." J Biochem **126**(5): 962-968.

N

- Ning, X., J. Guo, et al. (2008). "Visualizing metabolically labeled glycoconjugates of living cells by copper-free and fast Huisgen cycloadditions." Angew Chem Int Ed Engl **47**(12): 2253-2255.
- North, S. J., J. Jang-Lee, et al. (2010). "Mass spectrometric analysis of mutant mice." Methods Enzymol **478**: 27-77.

O-P-Q

- Ober, E. A., H. Verkade, et al. (2006). "Mesodermal Wnt2b signalling positively regulates liver specification." Nature **442**(7103): 688-691.
- Okuda, T., N. Tokuda, et al. (2006). "Targeted disruption of Gb3/CD77 synthase gene resulted in the complete deletion of globo-series glycosphingolipids and loss of sensitivity to verotoxins." J Biol Chem **281**(15): 10230-10235.
- Paesold-Burda, P., C. Maag, et al. (2009). "Deficiency in COG5 causes a moderate form of congenital disorders of glycosylation." Hum Mol Genet **18**(22): 4350-4356.
- Pagano, R. E. (2003). "Endocytic trafficking of glycosphingolipids in sphingolipid storage diseases." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **358**(1433): 885-891.
- Palaima, E., N. Leymarie, et al. (2010). "The *Caenorhabditis elegans* bus-2 mutant reveals a new class of O-glycans affecting bacterial resistance." J Biol Chem **285**(23): 17662-17672.
- Palonpon, A. F., J. Ando, et al. (2013). "Raman and SERS microscopy for molecular imaging of live cells." Nat Protoc **8**(4): 677-692.
- Pankova-Kholmyansky, I., A. Dagan, et al. (2003). "Ceramide mediates growth inhibition of the *Plasmodium falciparum* parasite." Cell Mol Life Sci **60**(3): 577-587.
- Park, E. I., Y. Mi, et al. (2005). "The asialoglycoprotein receptor clears glycoconjugates terminating with sialic acid alpha 2,6GalNAc." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(47): 17125-17129.
- Petit, D., R. E. Teppa, et al. (2013). "A practical approach to reconstruct evolutionary history of animal sialyltransferases and gain insights into the sequence-function relationships of Golgi-glycosyltransferases." Methods Mol Biol **1022**: 73-97.
- Petrache, I., K. Kamocki, et al. (2013). "Ceramide synthases expression and role of ceramide synthase-2 in the lung: insight from human lung cells and mouse models." PLoS One **8**(5): e62968.
- Pilobello, K. T. and L. K. Mahal (2007). "Deciphering the glycode: the complexity and analytical challenge of glycomics." Curr Opin Chem Biol **11**(3): 300-305.

- Puri, V., J. R. Jefferson, et al. (2003). "Sphingolipid storage induces accumulation of intracellular cholesterol by stimulating SREBP-1 cleavage." J Biol Chem **278**(23): 20961-20970.
- Puri, V., R. Watanabe, et al. (1999). "Cholesterol modulates membrane traffic along the endocytic pathway in sphingolipid-storage diseases." Nat Cell Biol **1**(6): 386-388.
- Quental, R., L. Azevedo, et al. (2010). "Comparative analyses of the Conserved Oligomeric Golgi (COG) complex in vertebrates." BMC Evol Biol **10**: 212.

R

- Rabouille, C., N. Hui, et al. (1995). "Mapping the distribution of Golgi enzymes involved in the construction of complex oligosaccharides." J Cell Sci **108 (Pt 4)**: 1617-1627.
- Rafiq, M. A., A. W. Kuss, et al. (2011). "Mutations in the alpha 1,2-mannosidase gene, MAN1B1, cause autosomal-recessive intellectual disability." Am J Hum Genet **89**(1): 176-182.
- Ramaekers, V. T., H. Stibler, et al. (1991). "A new variant of the carbohydrate deficient glycoproteins syndrome." J Inherit Metab Dis **14**(3): 385-388.
- Reynders, E., F. Foulquier, et al. (2009). "Golgi function and dysfunction in the first COG4-deficient CDG type II patient." Hum Mol Genet **18**(17): 3244-3256.
- Rind, N., V. Schmeiser, et al. (2010). "A severe human metabolic disease caused by deficiency of the endoplasmatic mannosyltransferase hALG11 leads to congenital disorder of glycosylation-Ip." Hum Mol Genet **19**(8): 1413-1424.
- Rizzo, R., S. Parashuraman, et al. (2013). "The dynamics of engineered resident proteins in the mammalian Golgi complex relies on cisternal maturation." J Cell Biol **201**(7): 1027-1036.
- Robijn, M. L., C. A. Koeleman, et al. (2007). "Schistosoma mansoni eggs excrete specific free oligosaccharides that are detectable in the urine of the human host." Mol Biochem Parasitol **151**(2): 162-172.
- Rose, D. R. (2012). "Structure, mechanism and inhibition of Golgi alpha-mannosidase II." Curr Opin Struct Biol **22**(5): 558-562.
- Rosnoblet, C., R. Peanne, et al. (2013). "Glycosylation disorders of membrane trafficking." Glycoconj J **30**(1): 23-31.
- Rostovtsev, V. V., L. G. Green, et al. (2002). "A stepwise huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes." Angew Chem Int Ed Engl **41**(14): 2596-2599.
- Rubinstein, A. L. (2003). "Zebrafish: from disease modeling to drug discovery." Curr Opin Drug Discov Devel **6**(2): 218-223.

S

- Sakuraba, H., F. Matsuzawa, et al. (2002). "Molecular and structural studies of the GM2 gangliosidosis 0 variant." J Hum Genet **47**(4): 176-183.
- Salic, A. and T. J. Mitchison (2008). "A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(7): 2415-2420.
- Sandhoff, R. (2010). "Very long chain sphingolipids: tissue expression, function and synthesis." FEBS Lett **584**(9): 1907-1913.
- Sandhoff, R., R. Geyer, et al. (2005). "Novel class of glycosphingolipids involved in male fertility." J Biol Chem **280**(29): 27310-27318.
- Schaper, W., J. Bentrop, et al. (2012). "Identification and biochemical characterization of two functional CMP-sialic acid synthetases in Danio rerio." J Biol Chem **287**(16): 13239-13248.

- Schneider, A., C. Thiel, et al. (2012). "Successful prenatal mannose treatment for congenital disorder of glycosylation-Ia in mice." *Nat Med* **18**(1): 71-73.
- Seelhorst, K., C. Stacke, et al. (2013). "N-glycosylations of human alpha1,3-fucosyltransferase IX are required for full enzyme activity." *Glycobiology* **23**(5): 559-567.
- Shaw, L. and R. Schauer (1988). "The biosynthesis of N-glycoloylneuraminic acid occurs by hydroxylation of the CMP-glycoside of N-acetylneuraminic acid." *Biol Chem Hoppe Seyler* **369**(6): 477-486.
- Shestopalov, I. A. and J. K. Chen (2010). "Oligonucleotide-based tools for studying zebrafish development." *Zebrafish* **7**(1): 31-40.
- Simpson, M. A., H. Cross, et al. (2004). "Infantile-onset symptomatic epilepsy syndrome caused by a homozygous loss-of-function mutation of GM3 synthase." *Nat Genet* **36**(11): 1225-1229.
- Smith, M. H., H. L. Ploegh, et al. (2011). "Road to ruin: targeting proteins for degradation in the endoplasmic reticulum." *Science* **334**(6059): 1086-1090.
- Song, Y., K. Kitajima, et al. (1993). "Monoclonal antibody specific to alpha-2-->3-linked deaminated neuraminyl beta-galactosyl sequence." *Glycobiology* **3**(1): 31-36.
- Stanley, P. (2002). "Biological consequences of overexpressing or eliminating N-acetylglucosaminyltransferase-TIII in the mouse." *Biochim Biophys Acta* **1573**(3): 363-368.
- Staudinger, H. M., J. (1919). "Über neue organische Phosphorverbindungen III Phosphinmethylderivate und phosphinimine", *Helv. Chim.*" *Helv. Chim. Acta* **2**(1): 635.
- Stepan, H., M. Pabst, et al. (2012). "O-Glycosylation of snails." *Glycoconj J* **29**(4): 189-198.
- Stevens, J. and A. Rambaut (2001). "Evolutionary rate differences in trypanosomes." *Infect Genet Evol* **1**(2): 143-150.
- Sugita, M., Y. Nakano, et al. (1984). "Neutral glycosphingolipids of ova of the fresh-water bivalve, *Hyriopsis schlegelii*." *J Biochem* **95**(1): 47-55.
- Sugita, M., M. Nishida, et al. (1982). "Studies on glycosphingolipids of larvae of the green-bottle fly, *Lucilia caesar*. I. Isolation and characterization of glycosphingolipids having novel sugar sequences." *J Biochem* **92**(2): 327-334.
- Suzuki, A., N. Hiraoka, et al. (2001). "Molecular cloning and expression of a novel human beta-Gal-3-O-sulfotransferase that acts preferentially on N-acetylglucosamine in N- and O-glycans." *J Biol Chem* **276**(26): 24388-24395.
- Swarts, B. M., C. M. Holsclaw, et al. (2012). "Probing the mycobacterial trehalome with bioorthogonal chemistry." *J Am Chem Soc* **134**(39): 16123-16126.

T

- Talbot, W. S., B. Trevarrow, et al. (1995). "A homeobox gene essential for zebrafish notochord development." *Nature* **378**(6553): 150-157.
- Tangvoranuntakul, P., P. Gagneux, et al. (2003). "Human uptake and incorporation of an immunogenic nonhuman dietary sialic acid." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(21): 12045-12050.
- Teng, Q., D. R. Ekman, et al. (2013). "Impacts of 17alpha-ethynylestradiol exposure on metabolite profiles of zebrafish (*Danio rerio*) liver cells." *Aquat Toxicol* **130-131**: 184-191.
- Tenno, M., K. Ohtsubo, et al. (2007). "Initiation of protein O glycosylation by the polypeptide GalNAcT-1 in vascular biology and humoral immunity." *Mol Cell Biol* **27**(24): 8783-8796.
- Thiel, C. and C. Korner (2013). "Therapies and therapeutic approaches in Congenital Disorders of Glycosylation." *Glycoconj J* **30**(1): 77-84.

- Tian, E. and K. G. Ten Hagen (2006). "Expression of the UDP-GalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase family is spatially and temporally regulated during *Drosophila* development." *Glycobiology* **16**(2): 83-95.
- Tian, E. and K. G. Ten Hagen (2009). "Recent insights into the biological roles of mucin-type O-glycosylation." *Glycoconj J* **26**(3): 325-334.
- Tornøe, C. W., C. Christensen, et al. (2002). "Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regiospecific copper(i)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides." *J Org Chem* **67**(9): 3057-3064.
- Tran, D. T., L. Zhang, et al. (2012). "Multiple members of the UDP-GalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase family are essential for viability in *Drosophila*." *J Biol Chem* **287**(8): 5243-5252.
- Ungar, D., T. Oka, et al. (2002). "Characterization of a mammalian Golgi-localized protein complex, COG, that is required for normal Golgi morphology and function." *J Cell Biol* **157**(3): 405-415.

U-V-W

- Ungar, D., T. Oka, et al. (2005). "Subunit architecture of the conserved oligomeric Golgi complex." *J Biol Chem* **280**(38): 32729-32735.
- van Die, I., C. M. van Stijn, et al. (2010). "Structural and functional analysis of glycosphingolipids of *Schistosoma mansoni*." *Methods Enzymol* **480**: 117-140.
- van Halbeek, H., A. M. Strang, et al. (1994). "Structures of monosialyl oligosaccharides isolated from the respiratory mucins of a non-secretor (O, Lea+b-) patient suffering from chronic bronchitis. Characterization of a novel type of mucin carbohydrate core structure." *Glycobiology* **4**(2): 203-219.
- Varki, N. M. and A. Varki (2007). "Diversity in cell surface sialic acid presentations: implications for biology and disease." *Lab Invest* **87**(9): 851-857.
- Viljetic, B., I. Labak, et al. (2012). "Distribution of mono-, di- and trisialo gangliosides in the brain of Actinopterygian fishes." *Biochim Biophys Acta* **1820**(9): 1437-1443.
- Walsh, E. C. and D. Y. Stainier (2001). "UDP-glucose dehydrogenase required for cardiac valve formation in zebrafish." *Science* **293**(5535): 1670-1673.
- Wang, K. and Y. Luo (2013). "Defined surface immobilization of glycosaminoglycan molecules for probing and modulation of cell-material interactions." *Biomacromolecules* **14**(7): 2373-2382.
- Wells, N., J. Hettiarachchi, et al. (2003). "A cost-effectiveness analysis of eletriptan 40 and 80 mg versus sumatriptan 50 and 100 mg in the acute treatment of migraine." *Value Health* **6**(4): 438-447.
- Werz, D. B., R. Ranzinger, et al. (2007). "Exploring the structural diversity of mammalian carbohydrates ("glycospace") by statistical databank analysis." *ACS Chem Biol* **2**(10): 685-691.
- Wieruszkeski, J. M., J. C. Michalski, et al. (1987). "Structure of the monosialyl oligosaccharides derived from salivary gland mucin glycoproteins of the Chinese swiftlet (genus *Collocalia*). Characterization of novel types of extended core structure, Gal beta(1----3)[GlcNAc beta(1----6)] GalNAc alpha(1----3)GalNAc(-ol), and of chain termination, [Gal alpha(1----4)]0-1[Gal beta(1----4)]2GlcNAc beta(1----)."
J Biol Chem **262**(14): 6650-6657.
- Willett, R., D. Ungar, et al. (2013). "The Golgi puppet master: COG complex at center stage of membrane trafficking interactions." *Histochem Cell Biol* **140**(3): 271-283.
- Wopereis, S., D. J. Lefeber, et al. (2006). "Mechanisms in protein O-glycan biosynthesis and clinical and molecular aspects of protein O-glycan biosynthesis defects: a review." *Clin Chem* **52**(4): 574-600.
- Worrell, B. T., J. A. Malik, et al. (2013). "Direct evidence of a dinuclear copper intermediate in Cu(I)-catalyzed azide-alkyne cycloadditions." *Science* **340**(6131): 457-460.

- Wright, B. S., J. W. Snow, et al. (2003). "Synthesis of 4-hydroxysphinganine and characterization of sphinganine hydroxylase activity in corn." Arch Biochem Biophys **415**(2): 184-192.
- Wu, X., R. A. Steet, et al. (2004). "Mutation of the COG complex subunit gene COG7 causes a lethal congenital disorder." Nat Med **10**(5): 518-523.

X-Y-Z

- Xia, L., T. Ju, et al. (2004). "Defective angiogenesis and fatal embryonic hemorrhage in mice lacking core 1-derived O-glycans." J Cell Biol **164**(3): 451-459.
- Xue, J., Q. Zhao, et al. (2010). "Deglycosylation of Fc α R at N58 increases its binding to IgA." Glycobiology **20**(7): 905-915.
- Yahi, N., S. Baghdiguian, et al. (1992). "Galactosyl ceramide (or a closely related molecule) is the receptor for human immunodeficiency virus type 1 on human colon epithelial HT29 cells." J Virol **66**(8): 4848-4854.
- Yamakoshi, H., K. Dodo, et al. (2011). "Imaging of EdU, an alkyne-tagged cell proliferation probe, by Raman microscopy." J Am Chem Soc **133**(16): 6102-6105.
- Yamakoshi, H., K. Dodo, et al. (2012). "Alkyne-tag Raman imaging for visualization of mobile small molecules in live cells." J Am Chem Soc **134**(51): 20681-20689.
- Yamashita, T., A. Hashiramoto, et al. (2003). "Enhanced insulin sensitivity in mice lacking ganglioside GM3." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(6): 3445-3449.
- Yamashita, T., R. Wada, et al. (1999). "A vital role for glycosphingolipid synthesis during development and differentiation." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(16): 9142-9147.
- Yamashita, T., Y. P. Wu, et al. (2005). "Interruption of ganglioside synthesis produces central nervous system degeneration and altered axon-glia interactions." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(8): 2725-2730.
- Yazawa, S., S. A. Abbas, et al. (1986). "N-acetyl-beta-D-glucosaminyltransferases related to the synthesis of mucin-type glycoproteins in human ovarian tissue." Carbohydr Res **149**(1): 241-252.
- Zheng, T., H. Jiang, et al. (2011). "Tracking N-acetyllactosamine on cell-surface glycans in vivo." Angew Chem Int Ed Engl **50**(18): 4113-4118.
- Zheng, T., H. Jiang, et al. (2013). "Single-Stranded DNA as a Cleavable Linker for Bioorthogonal Click Chemistry-Based Proteomics." Bioconjug Chem.
- Zhu, J. Y. and K. M. Chan (2012). "Mechanism of cadmium-induced cytotoxicity on the ZFL zebrafish liver cell line." Metallomics **4**(10): 1064-1076.
- Zielinska, D. F., F. Gnad, et al. (2010). "Precision mapping of an in vivo N-glycoproteome reveals rigid topological and sequence constraints." Cell **141**(5): 897-907.

Les travaux présentés explorent la diversité structurale des glycanes dans l'organisme modèle du Poisson Zèbre et analysent la régulation des sialoconjugés lors d'évènements physiopathologiques particuliers. La première partie de mes travaux vise à étendre nos connaissances structurales sur la distribution des glycanes à l'échelle cellulaire et tissulaire grâce à l'étude d'un modèle majeur de vertébré, le poisson zèbre. Ces travaux s'inscrivent dans une optique de recherche fondamentale pour établir la première carte de glycosylation (glycosphingolipides ; *N*- et *O*-glycanes) des organes du poisson zèbre adulte. A terme, ces résultats permettront de mieux appréhender les relations structures-fonctions des glycanes au niveau des organismes entiers. La seconde partie de mes travaux se focalise sur le suivi structural et métabolique de la sialylation. Une première stratégie est basée sur l'utilisation d'un mime-alcyné de l'acide sialique que nous pouvons coupler à un fluorophore-azidé par « click-chemistry » pour visualiser les sialoconjugés en microscopie. Ainsi, nous avons étudié le métabolisme de l'acide sialique des fibroblastes de patients atteints de Maladie Congénitale de la Glycosylation ou pour suivre la métabolisation de l'acide sialique après une infection par le parasite intracellulaire *Toxoplasma gondii*. Une seconde stratégie s'intéresse à la régulation de la sialylation par des analyses structurales lors d'une infection parasitaire par *Trypanosoma cruzii* ou lors de la surexpression d'une sialyltransferase dans la lignée cellulaire MCF-7. Ces études révèlent d'importantes variations dans l'expression des sialoglycoconjugés.

Our studies investigated the structural diversity of glycans in zebrafish model organism and analyzed the regulation of sialoconjugates during specific pathophysiological events. First part of my work intends to expand our structural knowledge about the organisation of glycans at the cellular and tissue levels through the study of a major vertebrate model, the zebrafish. This study aims to establish the first map of glycosylation in zebrafish, including profiles of glycosphingolipids as well as *N*- and *O*-glycans of glycoproteins. These data reveal numerous novel structures, including oligofucosylated and oligosialylated glycosphingolipids, and inform us about the organization of glycans within each organ. These results will provide new insight into the structure-function relationships of glycans in whole organisms. Second part of my work focuses on the structural and metabolic monitoring of sialylation. One of the deployed strategies is based on the use of an alkyne analogue of sialic acid and that can specially bind to a fluorophore by click-chemistry for monitoring the sialoconjugates by fluorescence microscopy. This strategy has been implemented to study sialic acid metabolism of fibroblasts from patients with congenital disease of the glycosylation or to follow the sialic acid metabolism after infection with the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. A second strategy based on structural analyzes focuses on the regulation of sialic acid during parasitic infection by *Trypanosoma cruzii* or during an overexpression of sialyltransferase in MCF-7 cell line. These studies reveal significant variations in the expression of sialoconjugates.