

N° d'ordre : 42513

UNIVERSITÉ DE LILLE – FACULTÉ DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES

Ecole Doctorale Biologie-Santé (ED 446)

Thèse présentée par

Clément DELANNOY

pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université de Lille

Discipline : Aspects moléculaires et cellulaires de la Biologie

Spécialité : Biochimie et Biologie moléculaire

**Etude structurale des modifications de la glycosylation des
macrophages induites par *Mycobacterium bovis* BCG**

réalisée au sein de l'Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle
(UGSF, UMR CNRS 8576)

Soutenue publiquement le 11 Décembre 2017 devant le jury composé de :

Rapporteurs :

Pr. Muriel Bardor

Professeur des Universités, Glyco-MEV EA 4358, Rouen

Dr. Jacques Le Pendu

Directeur de recherche INSERM, INSERM UMR 892/CNRS UMR 6299, Nantes

Examineurs :

Pr. Fabrice Allain

Professeur des Universités, UMR CNRS 8576, Univ. Lille

Dr. Muriel Mercier-Bonin

Chargée de recherche INRA, Toxalim, INRA UMR1331, Toulouse

Dr. François Trottein

Directeur de recherche CNRS, CIIL, INSERM UMR 1019/CNRS UMR 8204, Lille

Directrice de thèse :

Pr. Elisabeth Elass-Rochard

Professeur des Universités, UMR CNRS 8576, Univ. Lille

Ces travaux de thèses ont été réalisés au sein du laboratoire :
Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle (UGSF, UMR CNRS 8576) :
Bâtiment C9, Avenue Mendeleïev
Cité Scientifique, 59 655,
Villeneuve d'Ascq
France

Remerciements

Tout d'abord, un grand merci au directeur de l'unité le **Pr. Christophe D'Hulst** de m'avoir accueilli au sein de l'UGSF.

Je tiens à remercier ensuite l'ensemble des membres du jury d'avoir accepté d'en faire partie. Merci au **Pr. Muriel Bardor** et au **Dr. Jacques le Pendu** de me faire l'honneur d'être mes rapporteurs. Je remercie également le **Dr. Muriel Mercier-Bonin**, le **Dr. François Trottein** et le **Pr. Fabrice Allain** d'avoir accepté d'être examinateurs, et en particulier le Pr. Fabrice Allain pour avoir bien voulu être Président du jury. J'adresse notamment des remerciements particuliers au Pr. Muriel Bardor et au Dr. François Trottein, d'avoir participé à mes différents comités de suivi de thèse et pour leurs conseils précieux.

Un énorme merci au **Pr. Elisabeth Ellass-Rochard** de m'avoir encadré pendant ces trois années. Merci d'avoir été patiente avec moi, de m'avoir appris tant de choses, surtout en biologie cellulaire et immunologie. Mais en plus du professeur, je remercie la personne pour m'avoir encouragé lorsque ce fût nécessaire, surtout lors de cette dernière année. Et surtout, je m'excuse pour tout le stress provoqué pendant ces trois ans.

J'éprouve aussi une extrême gratitude envers notre chef d'équipe, le **Dr. Yann Guérardel**, sans qui je n'aurais jamais pu intégrer le laboratoire. Je me souviens de la première fois où tu m'as encadré lors d'un stage à la fin de ma deuxième année de licence. Cette petite expérience a été déterminante car elle m'a donné à l'époque la passion pour l'étude de la glycosylation et pour la spectrométrie de masse. Ace moment, tu m'avais dit qu'il y aurait une place pour moi en Master et aujourd'hui, je te remercie de ton engagement envers moi.

Merci au **Dr. Yoann Rombouts** de m'avoir co-encadré lors de ma première année de thèse, et je te souhaite bonne chance pour ta nouvelle vie en cette belle ville rose.

Je remercie également les **Drs. Bernadette Coddeville** et **Shin-Yi Yu** pour leurs aides et conseils dans l'analyse des glycanes. Grâce à vous, j'ai pu me perfectionner dans l'analyse par spectrométrie de masse, mais aussi un grand merci pour votre gentillesse et d'avoir toujours accepté de m'aider moi mais également les autres étudiants en galère.

Merci aux Drs. **Sophie Groux-Degroote** et **Anne Harduin-Lepers** pour leur aide dans l'analyse des glycosyltransférases en qPCR. Merci en particulier à Sophie, tu as réussi à me faire faire de la biologie moléculaire, un pari pas gagné d'avance.

Merci à **Marlène** pour son aide en culture cellulaire mais aussi de toujours être là pour nous dépanner. Merci pour ton sourire et ta bonne humeur, un vrai rayon de soleil dans les couloirs du C9.

Merci au **Dr. Olivier Vidal** de m'avoir ouvert les portes du laboratoire de microbiologie au rez-de-chaussée. Grace à toi, j'ai goûté aux joies de faire de la culture en surchauffes. Merci pour tes conseils et ta disponibilité

Un grand merci à tous les membres de l'équipe « Glycobiologie structurale des interactions hôtes-pathogènes » et de la Plateforme « Pagès » pour ces quatre années passées ensemble. Merci à : **Christophe M, Christophe B, Fred K, Fred C** (Oui, ça marche par deux chez nous), **Florence, Isabelle, Manu, Nao et Cédric**.

Une attention particulière à mes colocataires du 202 et aux autres étudiants de l'équipe :

Merci à **Faustine** (Mamie pour nous), **Alexandre** (Mister Gainer), **Lin** (Rv3096) d'avoir rendu ce bureau si vivant !!! La prochaine fois, on prendra des meubles un peu mieux quand même !!! Je n'oublie pas non plus les exilés **James** (Arsenal FAN) et **Clémence** (Transporteuse de lin) et courage à tous pour la suite.

Je remercie particulièrement mes camarades/collègues/compagnons d'infortunes **Pierre-André** et **Thomas**. Malgré des sujets et approches scientifiques bien différents, la meilleure chose qu'on sache faire finalement, c'est le levé de coude !!!

Merci aussi à toute l'équipe administrative et à l'ensemble du personnel de l'unité pour leur aide et leur travail au quotidien.

Merci également à tous les doctorants de l'UGSF, anciens et actuels, avec qui j'ai partagé de supers moments. Merci aux Actuels **Maxence, Charles, Maxime, Sven, Justine, Sumeyye, Christophe, Julien, Clément, Adeline** et aux Anciens **Pierre, Jorick, Florent, Marie, Agata, Anne-Sophie, Cindy, Derifa, Eudoxie** et tous les autres.

Dans mon cas, la transition entre le professionnel et le personnel se fait assez naturellement.

Pour m'avoir emmené au C9 dès l'âge de 4 ans pour que je prenne mes marques un énorme merci à toute ma famille mais surtout à **mes parents** pour m'avoir poussé et soutenu toutes

ces années. Merci aussi de. Merci à ma grande sœur **Julie** et à la petite famille alsacienne, mon beau-frère **Gautier** et mes deux adorables nièces, **Louise** et **Jeanne**.

Et comme les amis, c'est la famille :

A vous les Coupains (Groupe Facebook certifié breveté) : **Thomas, Mathilde, Manon, Mathieu, Juliette, Romain, Aurélien, Madeline, Alix**. Merci les ptits potes pour toutes ces années et pour toutes les autres à venir !!

Merci à la famille Boul' (**Ninon et Bryan**). Merci pour les journées jeux et GOT et les moments ensemble

Merci à vous les filles : **Jeanne, Alex, Maité, Moyira et Karine**

Merci aux anciens : **Christian et Marie, Damien et Catherine, Rémi et Marylin, Patrick et Ghislaine** !! Merci pour tous les merveilleux moments chez les uns et les autres. Et donc Merci aux enfants : **Bart, Cyrielle, Agathe, Camille, Sylvain et Perrine** !!

Merci à ma belle-famille (**Dany, Jean-Pierre, Jordan, Pauline et les filles**) pour toute l'aide que vous nous apportez !!

Enfin, je vais terminer par la personne sans qui je n'aurais jamais pu réaliser cette thèse. Merci à ma moitié, **Steffi**, pour ton soutien depuis plus de trois ans. Jamais personne n'a cru en moi autant que toi, et si nous en sommes là tous les deux, c'est grâce à toi. Merci pour tous ces merveilleux moments ensemble, mais aussi d'être là pendant les périodes de doutes, de craintes, parfois de peurs car c'est dans ces moments-là qu'on se rend compte de l'importance de l'autre. Un chapitre de notre histoire prend fin, mais un autre va bientôt s'ouvrir pour notre plus grand bonheur.

Avant-propos

Ces travaux de thèse ont été réalisés sous la direction du Pr. Elisabeth Ellass-Rochard dans l'équipe « Glycobiologie structurale des interactions hôtes-pathogènes » dirigée par le Dr. Yann Guérardel au sein de l'Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle (UGSF), UMR 8576 CNRS, dirigée par le Pr. Christophe d'HULST. Ils ont bénéficié d'une allocation de Recherche du Ministère de l'Enseignement Supérieur de la Recherche et ont fait l'objet de publications, de communications orales et par affiche présentées ci-dessous :

Publications

- **Delannoy, C. P.**, Rombouts, Y., Groux-Degroote, S., Holst, S., Coddeville, B., Harduin-Lepers, A., Wuhrer, M., Ellass-Rochard, E., and Guérardel, Y. (2016) Glycosylation Changes Triggered by the Differentiation of Monocytic THP-1 Cell Line into Macrophages. *J. Proteome Res.* 16(1):156-169 (Article 1)

Travaux Collaboratifs:

- Drolez, A., Vandenhaute, E., **Delannoy, C. P.**, Dewald, J. H., Gosselet, F., Cecchelli, R., Julien, S., Dehouck, M.-P., Delannoy, P., and Mysiorek, C. (2016) ST6GALNAC5 Expression Decreases the Interactions between Breast Cancer Cells and the Human Blood-Brain Barrier. *Int. J. Mol. Sci.* 17(8): 1309. (Article 2)
- Vandermeersch, S., Vanbeselaere, J., **Delannoy, C. P.**, Drolez, A., Mysiorek, C., Guérardel, Y., Delannoy, P., and Julien, S. (2015) Accumulation of GD1 α Ganglioside in MDA-MB-231 Breast Cancer Cells Expressing ST6GalNAc V. *Mol. Basel Switz.* 20, 6913–6924 (Article 3)

Communications Orales

- **Clément DELANNOY**, Elisabeth ELASS et Yann GUERARDEL « Disturbance of macrophage glycosylation induced by *Mycobacterium bovis* BCG infection » 24th International Symposium of Glycoconjugates, Jeju, Corée du Sud, le 30 août 2017.
- **Clément DELANNOY**, Elisabeth ELASS-ROCHARD et Yann GUERARDEL « Structural Modifications of Macrophage Glycosylation induced by *Mycobacterium bovis* BCG infection » Mycobactéries 2017, 5^e conférence MYCOCLUB, Montigny-le-Bretonneux, France, le 29 Mai 2017
- **Clément DELANNOY**, Yoann ROMBOUITS, Sophie GROUX-DEGROOTE, Stephanie HOLST, Bernadette CODDEVILLE, Anne HARDUIN-LEPERS, Manfred WUHRER, Elisabeth ELASS-ROCHARD et Yann GUERARDEL « Variations de la glycosylation des macrophages induites par

des mycobactéries et leurs glycoconjugués » Journées scientifiques de l'UMR8576, Villeneuve d'Ascq, France, le 28 octobre 2016.

Communications par Affiche

- **Clément DELANNOY**, Sophie GROUX-DEGROOTE, Bernadette CODDEVILLE, Anne HARDUIN-LEPERS, Elisabeth ELASS-ROCHARD et Yann GUERARDEL « Variations de la glycosylation des macrophages induites par des mycobactéries » Doctoriales 2017, Lille, France, le 14 Mai 2017.
- **Clément DELANNOY**, Yoann ROMBOUS, Sophie GROUX-DEGROOTE, Stephanie HOLST, Bernadette CODDEVILLE, Anne HARDUIN-LEPERS, Manfred WUHRER, Elisabeth ELASS-ROCHARD et Yann GUERARDEL « Deciphering the glycosylation changes occurring during the differentiation and the activation of monocytic THP-1 cell line into macrophages » 16^{ème} Journée André Verbert, Lille, France, le 5 Septembre 2016.
- **Clément DELANNOY**, Yoann ROMBOUS, Sophie GROUX-DEGROOTE, Stephanie HOLST, Bernadette CODDEVILLE, Anne HARDUIN-LEPERS, Manfred WUHRER, Elisabeth ELASS-ROCHARD et Yann GUERARDEL « Deciphering the glycosylation changes occurring during the differentiation and the activation of monocytic THP-1 cell line into macrophages » 26^{es} Journées du Groupe Français des Glycosciences, Aussois, du 23 au 27 mai 2016
- **Clément DELANNOY**, Yoann ROMBOUS, Sophie GROUX-DEGROOTE, Stephanie HOLST, Bernadette CODDEVILLE, Anne HARDUIN-LEPERS, Manfred WUHRER, Elisabeth ELASS-ROCHARD et Yann GUERARDEL « Alteration in the cell glycosylation during the macrophagic differentiation of human monocytic leukemia cell line THP-1, by phorbol myristate acetate » 26^{ème} Joint Glycobiology Meeting, Lille, France, du 25 au 27 Octobre 2015

Missions

- **Novembre 2014** : Mission à l'université de Leiden (LUMC) de deux semaines dans la mise en place d'une méthode adaptée à la purification et l'analyse des *N*-glycannes natifs à partir de microquantités

Résumé

Les macrophages sont des cellules du système immunitaire inné qui induisent et régulent la réponse inflammatoire, tout en contribuant à la mise en place de l'immunité adaptative, notamment par la présentation d'antigènes. La glycosylation de la membrane cellulaire est impliquée dans les différents processus physiopathologiques, tels que la défense de l'hôte ou la réponse inflammatoire, mais peu de travaux ont décrit les variations structurales de la glycosylation liées à la différenciation des monocytes en macrophages. La lignée monocyttaire humaine THP-1 est couramment utilisée comme modèle d'étude des macrophages, après traitement par le phorbol myristate acétate (PMA). Basée sur ces observations, la première partie de notre étude a été de mettre en évidence les variations du glycome lors de cette différenciation. L'analyse des données par spectrométrie de masse MALDI-TOF a démontré que la différenciation des cellules monocytaires THP-1 en macrophages induit une biosynthèse accrue des gangliosides, mais aussi une augmentation du taux de *N*-glycannes complexes et de leur degré de ramification. Ces résultats corrélerent avec l'expression des glycosyltransférases et des glycosidases impliquées dans la maturation et l'élongation des glycannes.

La suite de nos travaux a été d'observer cette glycosylation des macrophages dans un contexte infectieux. Suite à l'exposition à un pathogène, la machinerie de glycosylation peut être également perturbée par l'environnement cellulaire et inflammatoire. Ces dernières années, des études transcriptomiques ont démontré que l'infection ou la stimulation de macrophages humains par des mycobactéries modulent l'expression de certains gènes impliqués dans les processus de glycosylation. L'hypothèse qui en découle est que, lors d'une infection mycobactérienne, la glycosylation des macrophages est régulée soit par l'environnement cellulaire soit par le pathogène. Le deuxième objectif de notre étude a été de déterminer les modifications structurales de la glycosylation suite à une infection mycobactérienne. Pour ce faire, les macrophages issus de la lignée THP-1 et de monocytes sanguins humains ont été infectés par *Mycobacterium bovis* BCG. Les glycannes libérés des macrophages ont été analysés par spectrométrie de masse MALDI-TOF. À la suite de l'infection par *M. Bovis* BCG, les macrophages présentent des différences de *N*-glycosylation. L'analyse des résultats obtenus montre une modification de la ramification et une augmentation des niveaux de fucosylation des *N*-glycannes de type complexe. Ces différences de fucosylation ont été confirmées par l'utilisation en cytométrie en flux de lectines végétales fluorescentes.

L'ensemble de ces résultats nous indiquent que la glycosylation des cellules hôte subit un remodelage suite à l'infection mycobactérienne. La perspective qui en résulte serait de déterminer si ces variations sont la conséquence de l'activation de la réponse immunitaire, ou bien un mécanisme qui a pour but de favoriser le processus infectieux.

Abstract

Macrophages mediate innate immune system through the initiation and regulation of inflammation and contribute to adaptive immunity *via* antigen processing. Cell surface glycosylation has been widely described to be involved in different physiological or pathological processes, such as host defense, immunological and inflammatory responses but much less is known about the variations of glycosylation related to the differentiation of monocytes into macrophages. Human monocytic cell line THP-1 is frequently used as macrophage-like models, after treatment with phorbol myristate acetate (PMA). Based on these observations, the first aim of our study was to highlight the glycome variation during the differentiation of the human monocytic THP-1 cell line into macrophages. In this study, MALDI-TOF data analysis showed that the differentiation of monocytic THP-1 cells into macrophages induced gangliosides biosynthesis, but also an increase of complex *N*-glycan and the degree of branching. These data were correlated with the expression pattern of glycosyltransferases and glycosidases involved in glycan elongation and trimming.

The rest of our work was then to observe macrophages glycosylation in an infectious context. Following pathogens infection, glycosylation machinery can be also disturbed by the cellular environment. In recent years, several studies have shown that infection or stimulation of human macrophages with mycobacteria could modulate gene expression related to glycometabolism. These data establish that during mycobacterial infection, glycosylation of macrophages is finely regulated by the cellular environment or by the pathogen. The second purpose of our study is to determine the structural modifications of glycosylation after mycobacterial infection. To accomplish this, macrophages derived from THP-1 and from PBMC (peripheral blood mononuclear cells) were infected with *mycobacterium bovis BCG*. Once the macrophages are infected, glycans were released by chemical extraction and enzymatic digestion. After purification, different glycans were analysed by MALDI-TOF spectrometry. To confirm our results, we have also performed FACS analysis using plant lectins. Following *M. bovis BCG* infection, macrophages present different pattern of *N*-glycosylation. Analysis of data obtained by mass spectrometry shows antennarisation modification of complex type *N*-glycans and variations of fucosylation level. All these results indicate that host glycosylation undergoes remodeling following mycobacterial infection. The resulting perspective would be to determine if these variations are the consequence of the immune response activation, or a mechanism that promotes the infectious process.

Abréviations

Ac : Anticorps

ACN : acétonitrile

ADN : acide désoxyribonucléique

AG : arabinogalactane

AP1 : Activator protein 1

ARN : acide ribonucléique

Asn : asparagine

ATP : adénosine triphosphate

BabA : blood group antigen binding adhesin

BIP : binding immunoglobulin protein

BSA : bovin serum albumine

CagA : cytotoxin-associated gene A

CARD : caspase activation and recruitment domains

CD : cluster de différenciation

Cdc42 : cell division cycle

CDP : common dendritic cell precursor

CERT : ceramide transfer protein

CHST : carbohydrate *sulfotransferase*

CIITA : MHC-II transactivator

CLR : C-type lectin receptor

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

CMP-Neu5Ac : cytidine-5'-monophospho-*N*-acetylneuraminic acid

CNX : calnéxine

CPA : cellules présentatrices d'antigènes

CRD : cystein rich domain

CREB : C-AMP Response Element-binding protein

CRP : C reactive protein

CRT : calréticuline

CTLD : C-type lectin domain

DAMPs : danger-associated molecular patterns

DAP : diaminopimelic acid

DAT : di-acyltréhalose

DC-SIGN : Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin

DD : death domain

DISC : Death-Inducing Signaling Complex

DMSO : diméthylsulfoxyde

Dol-P : dolichol phosphate

DPI : di-sulphide isomerase

DTT : Dithiothreitol

EDEM : ER-degradation enhancing α -mannosidase-like protein

EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid

EEE : tri acide

EGF : epidermal growth factor

ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay

ERAD : ER-Associated degradation

ERK : Extracellular-Regulated Kinase

FADD : Fas-Associated protein with Death Domain

FITC : fluorescein isothiocyanate

FNII : fibronectin type II domain

FUT : fucosyltransférase

Gal : galactose

GalCer : galactosylcéramide

GalNAc : *N*-acétylgalactosamine

GDP : guanosine diphosphate

Glc : glucose

GlcCer : glucosylcéramide

GlcNAc : β -*N*-acétylglucosamine

GlcNAc6ST : GlcNAc-6-sulfotransférases

GlyCAM-1 : glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1

GM-CSF : Granulocyte-macrophage colony stimulating factor

GSL : glycosphingolipides

GTP : guanosine tri phosphate

HPRT : Hypoxanthine-guanine PhosphoRibosylTransferase

HSC : Hematopoietic stem cells

HSP : heat shock protein

ICAM3 : intercellular adhesion molecule-3
 Ig : immunoglobuline
 IKK β : I κ B Kinase
 IL : interleukine
 INF- γ : interféron γ
 iNOS : inducible nitric oxide synthase
 IRAK4 : IL1R Associated Kinase 4
 ITAM : Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
 iTreg : T régulateur inductible
 JNK : c-Jun-N-terminal Kinase
 LabA : LactiNac specific adhesin
 LacCer : lactosylcéramide
 LactiNac : di-N-acétyllactosamine
 LacNAc : N-acétyllactosamine
 LAM : lipoarabinomannane
 LBD : ligand binding domain
 LBP : LPS binding protein
 Le^x : Lewis^x
 LL : di leucine
 LLO : lipid linked-oligosaccharide
 LM : lipomannane
 LRR : leucine-rich repeat
 LTA : *Lotus tetranobus agglutinin*
 MAA : *Maackia amurensis agglutinin*
 mAGP : mycolyl arabinogalactane peptidoglycane
 MALDI-TOF : Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time of Flight
 Man : mannose
 MAN1 : mannosidase 1
 Man-LAM : mannosylated lipoarabinomannan
 MAPK : mitogen-activated protein kinases
 MAPKK6 : MAPK kinase 6
 MBL : mannose binding lectin
 mDC : myeloid dendritic cells
 MDP : muramyl dipeptide
 MDR : multiple drug resistance
 MGAT : N-acétylglucosaminyl transférase
 MP : myeloid precursor
 MPI : mannosyl phosphate inositol
 MPLA : Monophosphoryl lipid A
 MR : mannose receptor
 MyD88 : Myeloid differentiation primary response gene 88
 NAIP : neuronal apoptosis inhibitory protein
 NAM : N-acétyl-muramique
 NEMO : NF- κ B essential modulator
 NEU : neuraminidase
 NeuAc : acide neuraminique
 NGF : nerve growth factor
 NK : natural killer
 NLR : NOD-like receptors
 NO : nitric oxide
 NOD : nucleotide binding oligomerization domain
 OMS : organisation mondiale de la santé
 OST : oligosaccharidyl transférase
 PAMPs : pathogens-associated molecular patterns
 PAT : poly-acyltréhalose
 PBMCs : Peripheral blood mononuclear cells
 PBS : phosphate buffered saline
 PCR : Polymerase chain reaction
 pDC : plasmacytoid dendritic cells
 PE : phycoérythrine
 PGN : peptidoglycane
 PHA-L : *Phaseolus vulgaris leucoagglutinin*
 PI : phosphatidylinositol
 PIM : phosphatidyl-myo-inositol mannoside
 PIM₂ : phosphatidyl-myo-inositol dimannoside
 PLAD : pre ligand association domain

PMA : phorbol-12-myristate-13-acétate
 PNGase : Peptide:N-Glycosidase
 ppGalNAcT : polypeptide-N-acétylgalactosaminyltransférase
 PRR : pattern recognition receptor
 PSGL-1 : P-selectin glycoprotein ligand-1
 PVDF : polyvinylidene difluoride
 qPCR : Quantitative Real-Time PCR
RANTES : regulated on activation, normal T cell expressed and secreted
 RE : réticulum endoplasmique
 RIP : receptor-interacting protein
 RLR : RIG-I-like receptors
 ROS : reactive oxygen species
 RPMI : Roswell Park Memorial Institute
 SabA : sialic acid-binding *adhesin*
 SIGLEC : Sialic acid-binding Ig superfamily lectins
 SL : sulfatide
 sLe^x : sialyl-Lewis^x
 SNA : *Sambucus nigra* agglutinin
 SVF : sérum de veau foetal
 TAB1 : TAK1-binding protein
 TAK1 : TGF- β -activated kinase
 TAT : tri-acyltréhalose
 TBK1 : TANK (TRAF family member-Associated NF-KappaB activator)-Binding Kinase
 TCR : T-cell receptor
 TDM : tréhalose dimycolate
 TFA : trifluoroacetic acid
 TGF : tumor growth factor
 Th : T helper
 TIR : Toll/Interleukine-1 Receptor
 TIRAP : TIR domain containing adaptator protein
 TLR : toll like receptor
 TMM : tréhalose monomycolate
 TNF : tumor necrosis factor
 TPA : 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate
TRADD : TNFR-1 associated death domain protein
 TRAF : Tumor Necrosis Factor Receptor Associated Factor
 TRAIL-R : tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand-receptor
 TRAM : TIR-domain containing adaptator molecules
 Treg : T régulateur
 TRIF : TIR-domain containing adaptor-inducing interferon- β
 TTM : tréhalose trimycolate
 UDP : uridine diphosphate
 UEA-I : *Ulex europaeus I agglutinin*
 UGCG : UDP-Glucose ceramide glucosyltransferase
 UGGT : (UDP)-glucose:glycoprotein glucosyltransferase
VCAM-1 : vascular cell adhesion molecule 1
 VIH : *virus de l'immunodéficience humaine*
 XDR : extensively drug resistant

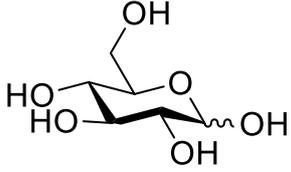
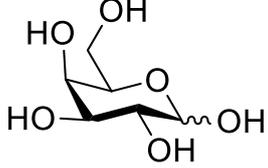
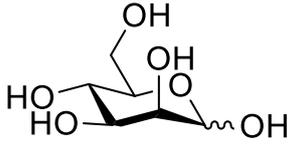
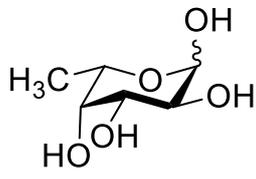
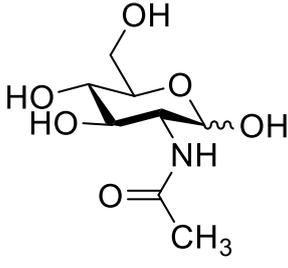
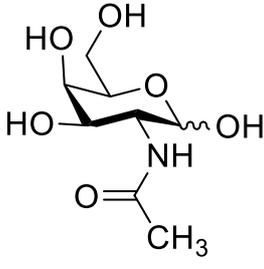
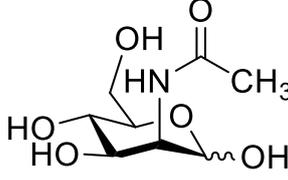
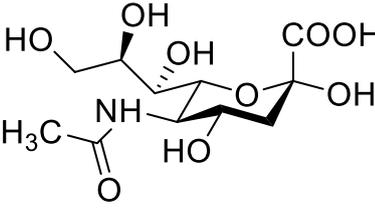
<p>Glucose <i>D-glucopyranose</i></p>		<p>Glc </p>
<p>Galactose <i>D-galactopyranose</i></p>		<p>Gal </p>
<p>Mannose <i>D-mannopyranose</i></p>		<p>Man </p>
<p>Fucose <i>6-déoxy-L-galactopyranose</i> <i>L-fucopyranose</i></p>		<p>Fuc </p>
<p><i>N</i>-acétyl-glucosamine <i>2-(Acétylamino)-2-déoxy-D-glucopyranose</i></p>		<p>GlcNAc </p>
<p><i>N</i>-acétyl-galactosamine <i>2-(Acétylamino)-2-déoxy-D-galactopyranose</i></p>		<p>GalNAc </p>
<p><i>N</i>-acétyl-mannosamine <i>2-(Acétylamino)-2-déoxy-D-mannopyranose</i></p>		<p>ManNAc </p>
<p>Acide <i>N</i>-acétyl-neuraminique <i>Acide 5-acétamido-3,5-didéoxy-D-glycéro-</i> <i>D-galacto-non-2-ulosonique</i></p>		<p>Neu5Ac </p>

Table des illustrations

<i>Figure 1 - Types de N-glycannes chez les mammifères</i>	7
<i>Figure 2 - Structure du Dolichol-Phosphate</i>	8
<i>Figure 3 - Synthèse du LLO (Lipid Link Oligosaccharide) après le cycle du dolichol phosphate</i>	9
<i>Figure 4 - Maturation Golgienne des N-glycannes</i>	12
<i>Figure 5 - Biosynthèses des O-glycannes de type mucine</i>	15
<i>Figure 6 - Structure de sphingosine et de céramide</i>	16
<i>Figure 7 - Biosynthèse de novo du céramide (d18:1 - C16:0) chez les mammifères</i>	19
<i>Figure 8 - Biosynthèse des glycosphingolipides de la famille des gangliosides et des globosides chez les mammifères</i>	20
<i>Figure 9 - Représentation schématique des unités lactosaminiques de type 1 et de type 2</i>	22
<i>Figure 10 - Représentation schématique-'un motif poly-N-acétyllactosamine</i>	22
<i>Figure 11 - Représentation des épitopes sanguins du système ABH</i>	23
<i>Figure 12 - Représentation schématique des différents motifs de type Lewis</i>	24
<i>Figure 13 - Représentation des différents degrés de sulfatation du motif Lewis X</i>	25
<i>Figure 14 – Polarisation des lymphocytes T CD4</i>	32
<i>Figure 15 - Différenciation des cellules dendritiques et des macrophages</i>	33
<i>Figure 16 - Polarisation des macrophages</i>	35
<i>Figure 17 – Phénotypes des macrophages M1</i>	36
<i>Figure 18 – Phénotypes des différents macrophages M2</i>	38
<i>Figure 19 - Représentation schématique de la structure des TLRs</i>	40
<i>Figure 20 - Activation des voies Myd88 dépendante et indépendante par différents TLRs</i>	43
<i>Figure 21 - Représentation schématique de la structure du récepteur à mannose</i>	45
<i>Figure 22 - Représentation schématique de la structure du DC-SIGN</i>	46
<i>Figure 23 – Recrutement des monocytes au niveau de l'endothélium</i>	50
<i>Figure 24 - Représentation schématique de la structure des L-, E- et P-sélectines</i>	51
<i>Figure 25 – Evolution du complexe Tuberculosis</i>	73
<i>Figure 26 - Représentation de la paroi des mycobactéries (Kaur et al., 2009)</i>	76
<i>Figure 27 - Représentation schématique de la structure de l'arabinogalactane</i>	77
<i>Figure 28 - Représentation schématique du phospho-myo-inositol hexamannoside tetra-acylé, du lipomannane et du lipoarabinomannane</i>	79
<i>Figure 29 - Cycle de vie des mycobactéries tuberculeuses</i>	83
<i>Figure 30 - Expression du marqueur CD11c après différenciation des monocytes THP-1 en macrophages, par le PMA</i>	97
<i>Figure 31 – Stratégie expérimentale utilisée pour comparer la glycosylation des cellules THP-1 indifférenciées et différenciées</i>	98
<i>Figure 32 - Mécanisme de la réaction d'éthyl-estérification sur des résidus d'acides sialiques liés en position 3 et en position 6</i>	99

<i>Figure 33 - Spectre de masse MALDI-TOF représentatif des GSLs perméthylés des cellules monocytaires THP-1.</i>	100
<i>Figure 34 - Fragmentation des glycanes par MS/MS illustrée par la nomenclature de Domon et Costello pour les glycanes natifs (A) ou perméthylés (B).</i>	101
<i>Figure 35 - Analyse MS/MS des GSLs perméthylés Gb4/GA1 des monocytes THP-1</i>	102
<i>Figure 36 - Analyse MS/MS de l'ion m/z 1933 des GSLs perméthylés GM1a/GM1b des cellules monocytaires THP-1.</i>	103
<i>Figure 37 - Spectre de masse MALDI-TOF représentatif des GSLs perméthylés des cellules THP-1 différenciées</i>	103
<i>Figure 38 – Composition relative en glycosphingolipides perméthylés isolés à partir de cellules THP-1 non différenciées et différenciées par PMA.</i>	105
<i>Figure 39 - Analyse MS/MS de l'ion m/z 2294 des GSLs perméthylés GD1a des cellules THP-1 différenciées par le PMA.</i>	105
<i>Figure 40 - Composition en céramide de l'ensemble des GSLs isolés à partir de cellules THP-1 non différenciées et différenciées par PMA.</i>	106
<i>Figure 41 - Spectre de masse MALDI-TOF représentatif des N-glycanes perméthylés des cellules THP-1 non différenciées.</i>	107
<i>Figure 42 - Analyse MS/MS de l'ion m/z 2967 des N-glycanes complexes perméthylés issus de la lignée monocytaires THP-1</i>	109
<i>Figure 43- Spectre de masse MALDI-TOF représentatif des N-glycanes éthyl-estérifiés des cellules THP-1 non différenciées.</i>	110
<i>Figure 44 - Modifications structurales des profils MS des N-glycanes perméthylés lors de la différenciation des THP-1.</i>	111
<i>Figure 45 - Spectre de masse MALDI-TOF représentatif des N-glycanes perméthylés des cellules THP-1 différenciées.</i>	112
<i>Figure 46 - Analyse MS/MS de l'ion m/z 2967 des N-glycanes complexes perméthylés issus des cellules THP-1 différenciées par le PMA</i>	113
<i>Figure 47- Spectre de masse MALDI-TOF représentatif des N-glycanes éthyl-estérifiés des cellules THP-1 différenciées.</i>	114
<i>Figure 48 - Modifications structurales des profils MS des N-glycanes éthyl-estérifiés lors de la différenciation des THP-1.</i>	115
<i>Figure 49 - Quantification relative des N-glycanes éthyl-estérifiés de haut poids moléculaire après différenciation.</i>	116
<i>Figure 50 - Spectre de masse MALDI-TOF représentatif des O-glycanes perméthylés des cellules THP-1 non différenciées.</i>	117
<i>Figure 51 - Détection des épitopes Lewis X et Sialyl Lewis X à la surface cellulaire des cellules THP-1 monocytaires et macrophagiques.</i>	119

<i>Figure 52 - Représentation schématique du début de la voie de biosynthèse des gangliosides et des N-glycannes (A) et expression des ARNm des glycosyltransférases impliquées dans la biosynthèse des N-glycannes et des GSLs (B).</i>	120
<i>Figure 53 - Sécrétion des cytokines pro-inflammatoires par les cellules THP1 (A) et MDMs (B) après 24h d'infection par M. bovis BCG</i>	162
<i>Figure 54 - Expression des marqueurs à la surface des macrophages après 48h d'infection par M. bovis BCG</i>	163
<i>Figure 55 - Activation des macrophages après incubation par le PAM₃-LP₁₉</i>	164
<i>Figure 56 - Spectre de masse MALDI-TOF représentatif des GSLs perméthylés des cellules THP-1 différenciées témoins (A) et infectées par M. bovis BCG (B)</i>	165
<i>Figure 57 - Spectre de masse MALDI-TOF représentatif des GSLs perméthylés des cellules THP-1 différenciées témoins (A) et activées par le lipopeptide synthétique PAM₃-LP₁₉ (B)</i>	166
<i>Figure 58 - Composition en glycosphingolipides perméthylés isolés à partir de cellules THP-1 différenciées témoins et activées par le lipopeptide synthétique PAM₃-LP₁₉</i>	167
<i>Figure 59 - Spectre de masse MALDI-TOF représentatif des GSLs perméthylés des MDM témoins (A) et infectées par M. bovis BCG (B)</i>	168
<i>Figure 60 - Spectre de masse MALDI-TOF représentatif des GSLs perméthylés des MDM témoins (A) et activées par le lipopeptide synthétique PAM₃-LP₁₉ (B)</i>	169
<i>Figure 61 - Modifications structurales des profils MS des N-glycannes perméthylés des cellules THP-1 différenciées infectées par M. bovis BCG</i>	170
<i>Figure 62 - Spectre de masse MALDI-TOF représentatif des N-glycannes perméthylés de Macrophages THP-1 (A) et infectés par M. bovis BCG (B)</i>	171
<i>Figure 63 - Modifications structurales des profils MS des N-glycannes perméthylés des cellules THP-1 différenciées activées par le lipopeptide synthétique PAM₃-LP₁₉</i>	172
<i>Figure 64 - Modifications structurales des profils MS des N-glycannes de type complexe perméthylés des cellules THP-1 différenciées activées par le lipopeptide synthétique PAM₃-LP₁₉</i>	173
<i>Figure 65 - Spectre de masse MALDI-TOF représentatif des N-glycannes perméthylés de Macrophages humains dérivés de monocytes sanguins témoins (A) et infectés par M. bovis BCG (B)</i>	174
<i>Figure 66 - Modifications structurales des profils MS des N-glycannes perméthylés des macrophages humains infectés par M. bovis BCG</i>	175
<i>Figure 67 - Fixation des lectines végétales fluorescentes sur les cellules THP-1 infectées par M. bovis BCG</i>	176
<i>Figure 68 - Fixation des lectines végétales fluorescentes sur les cellules THP-1 activées par le lipopeptide synthétique PAM₃-LP₁₉</i>	177
<i>Figure 69 - Fixation des lectines végétales fluorescentes sur les macrophages humains infectés par M. bovis BCG</i>	178
<i>Figure 70 - Détection des épitopes Lewis X et Sialyl Lewis X à la surface des cellules THP-1 infectées par M. bovis BCG (A) et activées par le lipopeptide synthétique PAM₃-LP₁₉ (B)</i>	179
<i>Figure 71 - Expression des ARNm des fucosyltransférases des cellules THP-1 infectées par M. bovis BCG</i>	180

<i>Figure 72 - Spectre de masse MALDI-TOF représentatif des GSLs perméthylés des cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse de souris</i>	<i>187</i>
<i>Figure 73 - Analyse MS/MS de l'ion m/z 1933 du GSL perméthylé GM1b des cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse de souris</i>	<i>188</i>
<i>Figure 74 - Analyse MS/MS de l'ion m/z 2182 des GSLs perméthylés GD1a/GD1α des cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse de souris.</i>	<i>189</i>
<i>Figure 75 - Spectre de masse MALDI-TOF représentatif des GSLs perméthylés des cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse de souris infectées par M. bovis BCG.....</i>	<i>189</i>
<i>Figure 76 - Spectre de masse MALDI-TOF représentatif des N-glycannes perméthylés des cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse de souris témoins (A) et infectées par M. bovis BCG (B).....</i>	<i>191</i>
<i>Figure 77 - Spectre de masse MALDI-TOF représentatif des O-glycannes perméthylés des cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse de souris</i>	<i>192</i>
<i>Figure 78 - Analyse MS/MS de l'ion m/z 1548 des O-glycannes des cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse de souris.....</i>	<i>192</i>
<i>Figure 79 - Spectre de masse MALDI-TOF représentatif des O-glycannes perméthylés des cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse de souris infectées par M. bovis BCG.</i>	<i>193</i>

Table des tableaux

<i>Tableau 1 - Noyaux des différentes familles de glycosphingolipides chez les mammifères</i>	17
<i>Tableau 2 - Principaux ligands des TLRs humains</i>	41
<i>Tableau 3 -Distribution des différentes sélectines</i>	51
<i>Tableau 4 : Modulation de l'expression des gènes de la glycosylation dans les macrophages humains infectés ou stimulés par des mycobactéries et les glycoconjugués mycobactériens</i>	70
<i>Tableau 5 - Affectation des ions moléculaires ([M + Na]⁺) observés dans les spectres MALDI-TOF de glycosphingolipides perméthylés de cellules THP-1 non-différenciées et différenciées par PMA.</i>	104
<i>Tableau 6 - Ions moléculaires [M + Na]⁺ observés dans les spectres MALDI-TOF de N-glycannes perméthylés des cellules THP-1 non différenciées</i>	108
<i>Tableau 7 - Affectation des ions moléculaires ([M + Na] +) observés dans les spectres MALDI-TOF des O-glycannes perméthylés de cellules THP-1 non-différenciées et différenciées par PMA</i>	117
<i>Tableau 8 - Lectines végétales fluorescentes utilisées</i>	176
<i>Tableau 9 - Affectation des ions moléculaires ([M + Na] +) observés dans les spectres MALDI-TOF de glycosphingolipides perméthylés des cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse de souris témoins et infectées par M. bovis BCG</i>	188
<i>Tableau 10 - Séquences des différentes amorces utilisées en qPCR</i>	210

Sommaire

Introduction générale	1
Généralités	5
Chapitre 1 : La Glycosylation des Mammifères	7
I - La <i>N</i> -Glycosylation chez les mammifères	7
A – Présentation	7
B – La biosynthèse des <i>N</i> -Glycannes	8
1 – <i>Initiation Réticulaire</i>	8
2 – <i>Maturation golgienne</i>	11
II - La <i>O</i> -Glycosylation de type mucine chez les mammifères.....	13
A – Présentation	13
B - Biosynthèse des <i>O</i> -glycannes chez les mammifères.....	14
III – Les Glycosphingolipides	16
A – Présentation	16
B – Biosynthèse des gangliosides	18
1 – <i>Synthèse du céramide</i>	18
2 – <i>Synthèse des gangliosides</i>	19
IV – Diversité Structurale et épitopes glucidiques	21
A – Unités de type 1 et de type 2	21
B – Motifs poly- <i>N</i> -acétyllactosamine	22
C – Epitopes glucidiques de type Lewis et de Type ABH.....	23
D – La sulfatation.....	25
V – Conclusion	26
Chapitre 2 : Les Macrophages et les cellules dendritiques dans l'immunité innée	28
I – Présentation générale du système immunitaire	28
A – L'immunité innée	29
B – L'immunité adaptative	30
II – Les Sentinelles du Système Immunitaire inné : les macrophages et les cellules dendritiques.....	33

A – Les Macrophages.....	34
1 – Les Macrophages M1	35
2 – Les Macrophages M2	36
B – Les cellules dendritiques	38
1 – Les Cellules Dendritiques Myéloïdes.....	38
2 – Les Cellules Dendritiques Plasmacytoïdes	39
III - Les Récepteurs de l'immunité Innée : les principaux PRRs	39
A – Les Tolls like receptors: TLRs.....	39
B – Le Récepteur à Mannose.....	44
C – Le récepteur DC-SIGN.....	46
D – Les récepteurs NLRs	47

Chapitre 3 : La Glycosylation : Régulateur des processus immunitaires

I – Recrutement cellulaire	49
A – Interaction Sélectines / Glycannes.....	50
1 – Présentation	50
2 – Rôle des fucosyltransférases	52
3 – Rôle des Sialyltransférases	52
B – Les Intégrines dans le recrutement cellulaire	53
II – Différenciation et maturation cellulaire	54
A – Différenciation monocyte/macrophage	54
B – Différenciation et maturation des cellules dendritiques	56
III – Régulation de la phagocytose par la glycosylation.....	57
IV – Présentation d'antigènes	59
A – Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I	59
B – Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II	59
C – Glycosylation des récepteurs des cellules T.....	60
V – Régulation de l'apoptose.....	61
A – Récepteurs TRAIL-R.....	62
B – Le récepteur Fas/CD95	63

C – Le récepteur au TNF (TNFR)	64
VI – Activation cellulaire et glycosylation.....	65
VII – Glycosylation de l’hôte lors d’infections bactériennes	67
A - <i>Helicobacter pylory</i> et infection gastrique.....	68
B – <i>Francisella tularensis</i> et infections des ganglions lymphatiques.....	69
C – Les infections mycobactériennes	69

Chapitre 4 : L’infection mycobactérienne : notre modèle d’étude pour l’analyse des changements de glycosylation de la cellule hôte

..... 72

I – Généralités sur les Mycobactéries	72
A – Le Complexe Mycobacterium Tuberculosis	72
B – Le modèle <i>Mycobacterium bovis BCG</i>	74
C – Les Mycobactéries atypiques	74
D – L’enveloppe des mycobactéries.....	74
1 – Introduction	74
2 – Le peptidoglycane.....	76
3 – L’arabinogalactane	77
4 – Les acides mycoliques	78
5 – Les glycolipides de type phosphatidylinositol.....	79
6 – Les autres lipides.....	80
II – Cycles infectieux des mycobactéries tuberculeuses.....	81
A – La tuberculose	81
1 – Présentation	81
2 – Cycle infectieux de la tuberculose.....	82
B – Principales étapes du processus infectieux.....	84
1 – Interaction des mycobactéries avec le système immunitaire.....	84
2 – Phagocytose des mycobactéries par les macrophages et les cellules dendritiques	85
3 – Inhibition de la formation du phagolysosome.....	85
4 – Régulation de la sécrétion des cytokines inflammatoires	86

Objectifs	89
Résultats et discussions	93
Chapitre 1 : Etude des variations de glycosylation lors de la différenciation de la lignée monocyttaire THP-1 en macrophages	95
I – Introduction.....	95
II - Résultats.....	97
A – Caractérisation des marqueurs de surface des macrophages.....	97
B – Extraction et purification des glycanes	98
C – Analyses en spectrométrie de masse des profils de glycosphingolipides	100
1 – Des cellules monocytaires THP-1	100
2 – Des cellules THP-1 différenciées par le PMA	103
D – Analyses en spectrométrie de masse des profils de N-glycosylation	106
1 – Des cellules monocytaires THP-1	106
2 – Des Cellules THP-1 différenciées par le PMA	110
E – Analyses en spectrométrie de masses des profils de O-glycosylation.....	116
F - Expression de surface des épitopes Lewis X et Sialyl Lewis X des cellules THP-1.	118
G - Analyse par qPCR des niveaux d'expression des gènes de la glycosylation.	119
III – Discussion	122
Chapitre 2 : Etude structurale des variations de la glycosylation des macrophages, induites par <i>M. bovis BCG</i> et des composés mycobactériens	160
I – Introduction.....	160
II – Résultats.....	162
A – Caractérisation phénotypique de l'activation des macrophages	162
B – Analyses des profils de glycosphingolipides après infection des macrophages par <i>M. bovis BCG</i>	165
1 – Macrophages THP-1 PMA	165
2 – Macrophages dérivés de monocytes sanguins	167
C – Analyses des profils de N-glycosylation après infection des macrophages par <i>M. bovis BCG</i>	169

1 – Macrophages THP-1 PMA	169
2 – Macrophages dérivés de monocytes sanguins	173
D - Détection des épitopes glucidiques à la surface des macrophages	175
E – Expression des différentes fucosyltransférases	179
III – Discussion	181
Chapitre 3 : Etude des variations de glycosylation lors de l'infection des cellules dendritiques murines par <i>Mycobacterium bovis BCG</i> ..	185
I - Introduction.....	185
II – Résultats Préliminaires	187
A – Analyses des profils de glycosphingolipides après infection des cellules dendritiques par <i>M. bovis BCG</i>	187
B – Analyses des profils de <i>N</i> -glycosylation après infection des cellules dendritiques par <i>M. bovis BCG</i>	190
C – Analyses des profils de <i>O</i> -glycosylation après infection des cellules dendritiques par <i>M. bovis BCG</i>	191
III - Discussion	194
Conclusion générale	196
Matériels et méthodes	200
I – Cultures cellulaires et Mycobactériennes	202
A - Culture cellulaire de lignée THP-1.....	202
B – Purification des monocytes issus de sang humains et différenciation en macrophages primaires (MDMs).....	202
C – Culture des mycobactéries de la souche <i>Mycobacterium bovis BCG</i>	203
D - Infection ou activation des macrophages.....	203
II – Purifications et analyses des glycoconjugués.....	203
A - Extraction et purification des glycolipides.....	203
B – Libération séquentielle et purification des <i>N</i> - et <i>O</i> -glycannes.....	204
C - Libération des <i>N</i> -glycannes sur membrane de PVDF.....	204
D – Relargage et purification des <i>N</i> -glycannes après extraction au Triton X-100	205
E – Analyse des glycannes par spectrométrie de masse.....	206

III – Quantification de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires après infection	206
IV – Expression des marqueurs de surfaces et des épitopes glucidiques... 207	
A – Analyse des marqueurs de surface par cytométrie en flux	207
1 - Lors de la différenciation des cellules THP-1 par le PMA	207
2 - Lors de l'activation des macrophages par <i>M. bovis</i> BCG	207
B – Détection des épitopes glucidiques par cytométrie en flux	207
V – Analyse des enzymes de la glycosylation par qPCR (Quantitative Real-Time-PCR)	209
Références	212
Annexe 1	250
Annexe 2	264

Introduction générale

La glycosylation est une modification majeure et ubiquitaire que l'on retrouve dans l'ensemble des cellules de mammifères. Elle consiste à la liaison covalente de structures osidiques nommées glycannes sur des protéines ou des lipides. Les glycoprotéines et les glycolipides vont former une famille de molécules appelées les glycoconjugués. Il existe une grande diversité structurale aussi bien au niveau des protéines que des lipides. A cela vient s'ajouter un nouveau niveau de complexité qu'est la structure de glycannes. Les chaînes glycaniques peuvent présenter un large éventail d'épitopes glucidiques différents, composés de monosaccharides terminaux comme le fucose ou encore l'acide sialique (Cummings, 2009). Dans le cas des protéines, la glycosylation se caractérise par l'ajout soit de chaînes polysaccharidiques sous la forme de *N*-glycannes, de *O*-Glycannes mais aussi de glycosaminoglycannes ; soit de monosaccharide simple comme la *O*-*N*-acétylglucosaminylation, la *O*-fucosylation ou la *O*-mannosylation. Pour les lipides, la glycosylation donne la grande famille des glycosphingolipides. Les glycannes associés aux différents glycoconjugués sont exposés au niveau de la membrane plasmique, à l'exception de la *O*-*N*-acétylglucosaminylation, et participent à de nombreux processus cellulaires (Pinho and Reis, 2015).

Ces glycoconjugués jouent notamment un rôle essentiel dans la régulation des différents événements mis en place lors de la réponse immunitaire. Cette régulation intervient par la fixation des différents ligands glycaniques aux récepteurs lectiniques qui tapissent la membrane plasmique des cellules immunitaires. Le système immunitaire est composé de différents types cellulaires comme les macrophages ou les cellules dendritiques qui vont former le système immunitaire inné. Ce système permet la mise en place rapide d'une réponse immunitaire avec la sécrétion de molécules inflammatoires dans le but de contrer les différents signaux de dangers comme les infections. L'action des différentes enzymes de la machinerie de glycosylation permet de réguler les différents phénomènes mis en place lors de la réponse immunitaire, et leur activité est modulée en fonction notamment de l'environnement cellulaire et inflammatoire.

Certaines mycobactéries sont des microorganismes capables de détourner la réponse immunitaire, car elles ont la capacité de court-circuiter les mécanismes de défense de l'hôte. Lors d'une infection, le système immunitaire va être alerté de la présence d'un pathogène grâce à la reconnaissance des antigènes mycobactériens par les récepteurs de l'immunité

innée. A partir de là, la réponse du système immunitaire va se mettre en place dans le but de contenir cette infection. Ces mécanismes vont devoir être régulés au cours du temps, et les glycanes portés par les différents acteurs également (Scriba *et al.*, 2017). Dans ce contexte, nous avons voulu étudier l'impact que peut avoir une infection mycobactérienne sur les différents profils de glycosylation des cellules de l'immunité innée, et en particulier des macrophages mais aussi des cellules dendritiques.

La première partie de manuscrit est consacrée à une recherche bibliographique séparée en quatre chapitres. Dans un premier temps, les différentes biosynthèses des principaux glycoconjugués (*N*-glycanes, *O*-glycanes et glycosphingolipides) sont abordées ainsi que la grande diversité des structures osidiques. Ensuite, après avoir décrit les principales cellules de l'immunité innée, nous allons nous intéresser à la régulation des différentes fonctions immunitaires par la glycosylation, mais également les modifications induites lors d'infections bactériennes. Enfin, le dernier chapitre est consacré à la présentation des mycobactéries, de l'organisation de leur paroi, mais surtout des interactions qui existent entre les différents composés de cette paroi avec le système immunitaire.

La seconde partie du manuscrit est dédiée à l'ensemble des résultats obtenus lors de mes travaux de thèse, divisés en trois chapitres. Afin d'étudier la glycosylation des macrophages dans un contexte infectieux, nous avons utilisé un modèle cellulaire : la lignée THP-1. L'étape de différenciation nécessaire à l'obtention d'un phénotype macrophagique a permis de mettre en place une méthodologie capable de montrer les variations de glycosylation. Les résultats obtenus dans ce chapitre ont notamment fait l'objet d'une publication parue dans *Journal of Proteome Research* (Article 1). Le second chapitre est, quant à lui, dédié à l'étude de la glycosylation des macrophages, obtenus à partir de la lignée THP-1, infectés par *Mycobacterium bovis BCG*. Dans cette même partie, nous avons étendu notre étude à un second modèle cellulaire, les macrophages dérivés des monocytes de sang humain. Les résultats obtenus dans cette partie font l'objet d'un manuscrit en cours de rédaction. Enfin, le dernier chapitre de nos travaux traite de résultats préliminaires sur l'infection des cellules dendritiques, obtenues à partir de la moelle osseuse de souris, par *Mycobacterium bovis BCG*.

Généralités

Chapitre 1 : La Glycosylation des Mammifères

I - La *N*-Glycosylation chez les mammifères

A – Présentation

Il est établi que près de la moitié des protéines humaines sont glycosylées, et contiennent en majorité des sites de *N*-glycosylation. La liaison des *N*-glycannes eucaryotes à une protéine résulte de la condensation de la fonction hémi-acétal d'une β -*N*-acétylglucosamine (GlcNAc) avec la fonction amine d'une asparagine (Asn). Ce résidu d'asparagine doit être au sein d'une séquence consensus Asn-X-Ser/Thr (Marshall, 1972), à la condition que l'acide aminé X soit différent de la proline.

Les *N*-glycannes sont constitués d'un noyau composé de cinq résidus osidiques $\text{Man}\alpha 1-6(\text{Man}\alpha 1-3)\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-\text{Asn}$. Ce noyau glycanique peut ensuite porter jusqu'à six antennes dont la nature permet de classer les *N*-glycannes en trois familles (Figure 1). Les glycannes de type oligomannosidique sont constitués uniquement de résidus de mannoses. Les glycannes de type complexe possèdent des antennes portant principalement des motifs lactosaminiques de type 1 $\text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc}\beta 1\text{R}$ ou de type 2 $\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1\text{R}$. Enfin, il existe des *N*-glycannes de type hybride avec des antennes appartenant aux glycannes de type oligomannosidique et aux glycannes de type complexe (Figure 1).

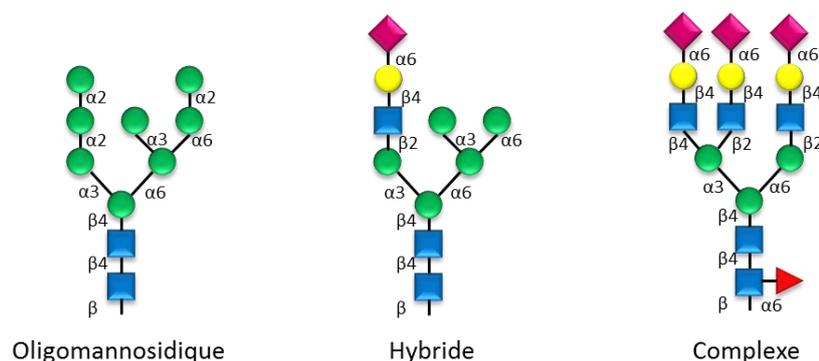


Figure 1 - Types de *N*-glycannes chez les mammifères

Représentation des différents *N*-glycannes de type oligomannosidique, hybride et complexe. Les types complexe et hybride portent des antennes qui peuvent présenter différents monosaccharides terminaux qui vont former des épitopes antigéniques comme le Lewis X et le Sialyl-Lewis X.

La synthèse des *N*-glycannes est un processus partagé entre deux organites : le réticulum endoplasmique (RE) et l'appareil de Golgi. La synthèse du noyau glycanique débute dans le réticulum et finit dans les premiers compartiments de l'appareil de Golgi. Le Golgi-médian et le trans-Golgi permettent la maturation des *N*-glycannes afin de former les antennes des glycannes de types hybride et complexe, et d'ajouter des sucres terminaux comme l'acide sialique ou le fucose (R Kornfeld and Kornfeld, 1985). Ces modifications sont à l'origine d'une grande variabilité structurale glycanique, leur conférant des propriétés fonctionnelles différentes.

B – La biosynthèse des *N*-Glycannes

1 – Initiation Réticulaire

La biosynthèse des *N*-glycannes est un processus complexe qui commence dans le réticulum endoplasmique (RE) par la synthèse d'un précurseur glycanique de 14 résidus osidiques, le LLO (Lipid Linked-Oligosaccharide). Ce précurseur tétradécasaccharidique est conjugué à un intermédiaire lipidique de type polyisoprénique : le dolichol phosphate (Dol-P) (Figure 2).

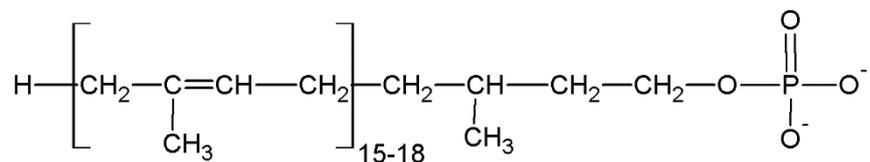


Figure 2 - Structure du Dolichol-Phosphate

La synthèse des *N*-glycannes débute par le transfert de GlcNAc-1P à partir d'UDP-GlcNAc sur un dolichol-phosphate pour obtenir un dolichol pyrophosphate *N*-acétylglucosamine (Dol-P-P-GlcNAc).

Les sept premiers résidus osidiques sont assemblés sur le Dol-P au niveau de la membrane plasmique du RE côté cytoplasmique, pour donner le Dol-P-P-GlcNAc₂Man₅. L'ajout des différents résidus se fait à partir des nucléotides sucres donneurs UDP-GlcNAc et GDP-Man. La synthèse du précurseur est initiée grâce à un complexe formé des glycosyltransférases ALG7/13/14 permettant l'ajout des deux résidus de GlcNAc sur le précurseur (Bickel *et al.*, 2005; Eckert *et al.*, 1998) (Figure 3).

Les enzymes ALG-7 transfèrent un GlcNAc-P sur le Dol-P pour donner du Dol-P-P-GlcNAc. Une fois le premier résidu de GlcNAc lié, ALG13/14 catalysent l'addition d'un second résidu de GlcNAc pour former le Dol-P-P-GlcNAc₂ (Lehrman, 1991; Lu *et al.*, 2012).

ALG1/2/11 ajoutent ensuite de manière successive les cinq résidus de mannose qui forment le Dol-P-P-GlcNAc₂Man₅ (Albright and Robbins, 1990; Cipollo *et al.*, 2001; Gao *et al.*, 2004).

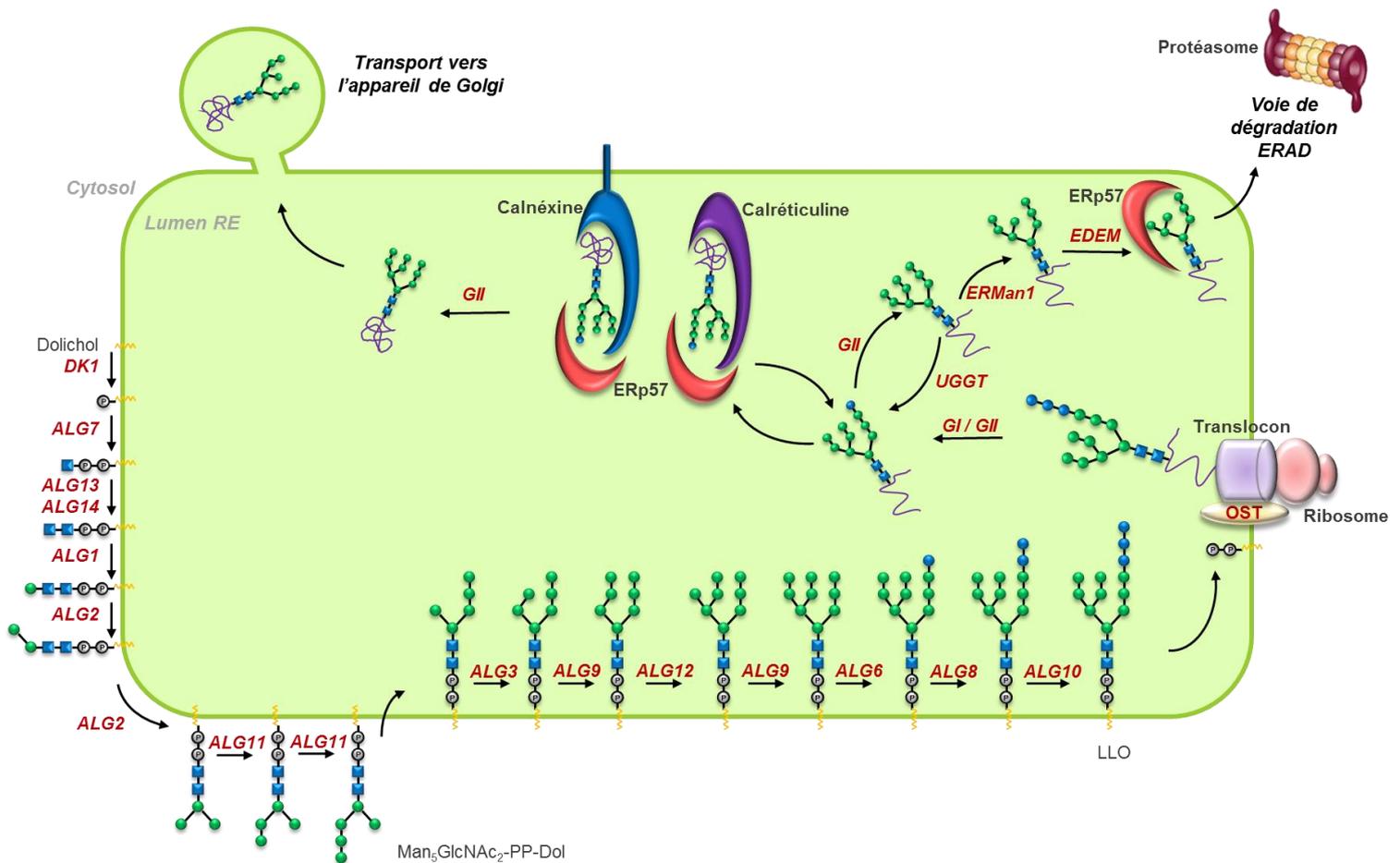


Figure 3 - Synthèse du LLO (Lipid Linked-Oligosaccharide) après le cycle du dolichol phosphate

Le dolichol phosphate est localisé sur la face cytoplasmique de la membrane du RE et reçoit du GlcNAc-1-P à partir d'UDP GlcNAc pour générer du Dol-P-P-GlcNAc (Moremen *et al.*, 2012). Le Dol-P-P-GlcNAc est allongé en Dol-P-P-GlcNAc₂Man₅ avant de basculer dans la face luminale du RE. Dans Le RE, quatre autres résidus de mannose et trois de glucose sont ajoutés à partir de Dol-P-Man et de Dol-P-Glc pour former le LLO. Le LLO est transféré sur la protéine néo-synthétisée par l'action de la sous unité STT3p du complexe OST.

Une fois cette structure achevée, les glycanes basculent vers la lumière du RE pour terminer la synthèse du précurseur. Pendant plusieurs années, il a été avancé que la protéine RFT1 était la flippase responsable de cette bascule (Helenius *et al.*, 2002). Mais en 2008, ces observations ont été remises en cause puisqu'il a été montré que RFT1 était nécessaire à la poursuite de la

synthèse du précurseur, mais ne possédait pas l'activité flippase en elle-même (Frank *et al.*, 2008; Rush, 2015).

Contrairement à la synthèse côté cytoplasmique qui utilise des nucléotides sucres, les substrats donneurs dans le réticulum sont du Dol-P-Man et du Dol-P-Glc. Les Dol-P-Man et le Dol-P-Glc sont formés au niveau de la face cytosolique du réticulum endoplasmique à partir de GDP-Man et UDP-Glc transférés sur une molécule de dolichol. Ces deux substrats doivent ensuite, comme le Dol-P-P-GlcNac₂Man₅, basculés vers la lumière du RE.

Une fois orientés vers la lumière du RE, trois enzymes, ALG3/9/12, ajoutent quatre nouveaux résidus de mannose pour obtenir un glycanne de 11 résidus (Sharma *et al.*, 2001). Les 3 derniers résidus de glucose sont liés par l'intermédiaire des enzymes ALG 6/8/10, et ainsi conclure la synthèse LLO (Figure 3).

Le précurseur achevé, il est transféré en bloc sur un résidu d'asparagine d'une des séquences consensus d'une protéine néo-synthétisée de façon co-translationnelle au niveau du RE grâce au complexe de l'oligosaccharyl transférase (OST) (Moremen *et al.*, 2012).

Le complexe OST humain est un complexe multiprotéique de 7 sous-unités, hautement conservé chez les mammifères. Ce complexe contient les sous unités ribophorine I (OST1p), ribophorine II (Swp1p), OST48 (Wbp1p), OST4 (OST4), Stt3-A/Stt3-B (Stt3p), N33/Tusc3 et IAP (OST3p et OST6p), et DAD1 (OST2p). Parmi ces sous unités, OST1p, Swp1p, Wbp1p, Stt3p et OST2p ont été montrées comme étant essentielles à la survie des levures, en particulier la sous unité Stt3p qui possède l'activité OST du complexe (Chavan and Lennarz, 2006; Mohorko *et al.*, 2011). Le complexe OST est ancré à la membrane. Il libère le LLO en hydrolysant la liaison entre le groupement phosphate et le premier résidu de GlcNac puis transfère le glycanne sur la protéine nouvellement traduite. Le transfert du précurseur glycanne se fait en parallèle de la traduction de l'ARNm qui code la protéine. La chaîne peptidique pénètre dans le RE via le translocon et plus précisément l'hétérotrimère Sec 61 qui facilite le transport de la protéine.

Suite au transfert du glycanne Glc₃Man₉GlcNac₂ sur la protéine naissante au niveau de la lumière du RE, les deux premiers résidus de glucose vont être hydrolysés par les glucosidases GI et GII, et ainsi donner la structure GlcNac₂Man₉Glc. Ce glycanne va servir de ligand aux couples de lectines réticulaires Calnexine (CNX)/ERp57 ou Calréticuline (CRT)/ERp57 (Ferris *et*

al., 2014). La reconnaissance du glycanne par ces lectines participe à la bonne mise en conformation des protéines synthétisées en induisant l'action de protéines chaperonnes BIP (Binding Immunoglobulin Protein) ou DPI (Protein Disulfide Isomerase).

Après le bon repliement de la protéine, la glucosidase GII libère le dernier résidu de glucose porté par le précurseur, formant ainsi le glycanne $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_9$ et dirige par la suite la protéine vers la voie de sécrétion Golgienne après digestion d'un mannose par la mannosidase ErMan1 formant le $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_8$. Dans le cas où la protéine serait mal conformée, elle va être re-glycosylée par l'UGGT ((UDP)-glucose:glycoprotein glucosyltransferase) et entrer à nouveau dans un cycle CNX/CRT.

Après plusieurs cycles CNX/CRT, il se peut que la protéine ne soit toujours pas idéalement conformée. Le glycanne est alors successivement hydrolysé par les mannosidases ErMan1 et EDEM (ER-degradation enhancing α -mannosidase-like protein) pour générer le glycanne $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_7$. Ce glycanne est reconnu par la protéine ERp57 uniquement, et non par CNX et CRT, induisant la translocation de la protéine vers le cytoplasme, sa poly-ubiquitinylation et sa dégradation au niveau du protéasome. Ce processus de dégradation des protéines est le complexe ERAD (ER-Associated degradation) et est spécifique des protéines mal conformées (Caramelo and Parodi, 2008; D'Alessio *et al.*, 2010; Ruggiano *et al.*, 2014; Yoshida, 2003).

2 – Maturation golgienne

Après avoir quittées le RE, les glycoprotéines passent à travers l'appareil de Golgi par transport vésiculaire où les glycannes sont susceptibles d'être modifiés par l'action des différentes glycosyltransférases membranaires réparties sur l'ensemble de l'appareil de Golgi (Reynders *et al.*, 2011). Au niveau du cis-Golgi, la mannosidase I (MAN1) hydrolyse trois résidus de mannose du $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ pour obtenir le $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$. Si l'action de la MAN1 n'est pas optimale, des *N*-glycannes de type oligomannosidique peuvent être retrouvés au niveau des protéines matures (Figure 4).

La synthèse des *N*-glycannes de type hybride et complexe débute par l'action de la *N*-acétylglucosaminyl transférase I (MGAT1) qui ajoute un résidu de *N*-acétylglucosamine en β 1-2 sur le mannose lié en α 1-3. Cette première étape se déroule au niveau du cis-Golgi et du médian-Golgi. Au niveau du médian-Golgi, le $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_3$ est ensuite digéré par la mannosidase II (MAN2) qui libère deux résidus de mannose et donne le $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_3$. Dans le

cas où l'action de la MAN2 ne serait pas effective, le glycanne porté par la protéine naissante sera de type hybride.

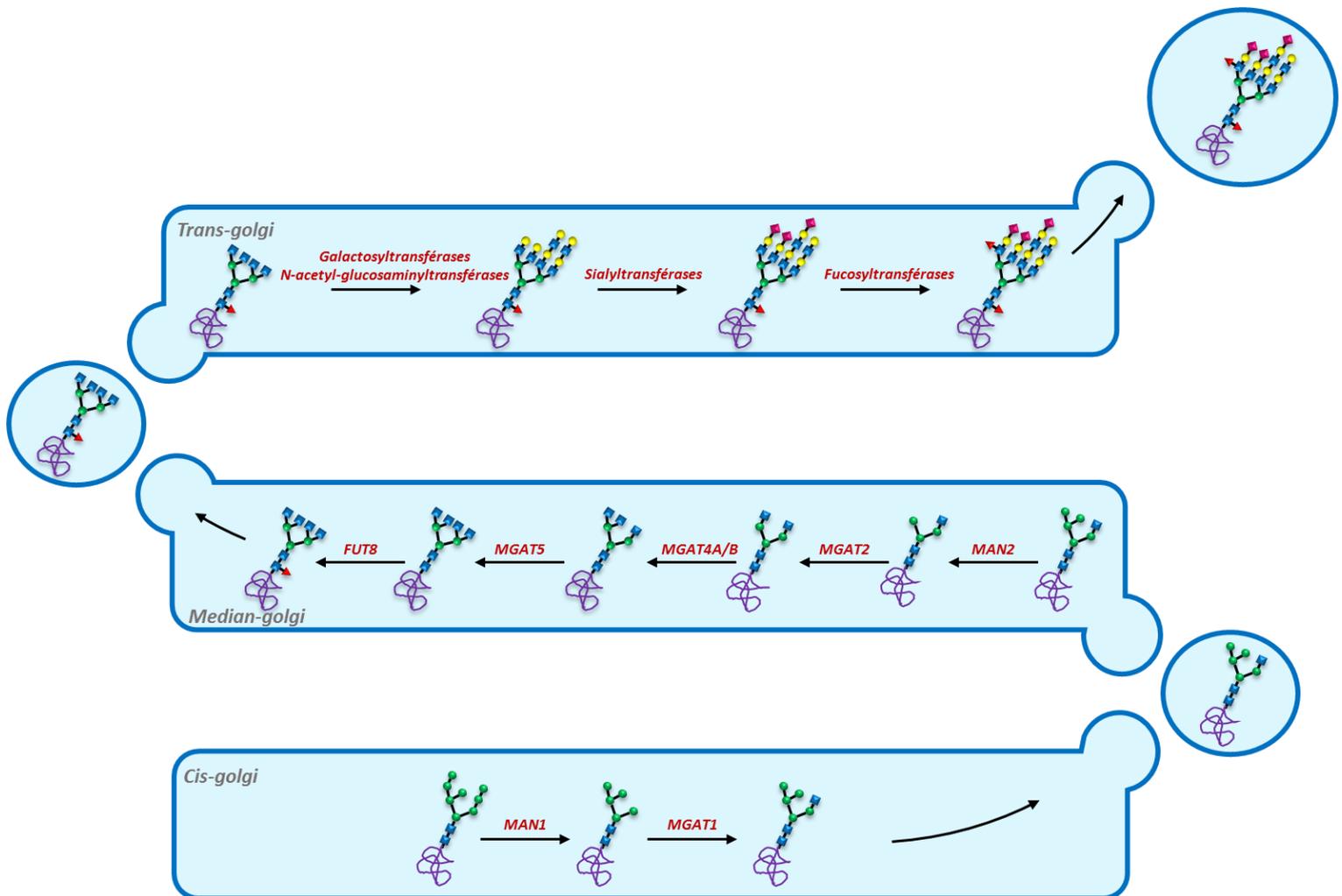


Figure 4 - Maturation Golgienne des N-glycannes.

Arrivés au niveau du cis-Golgi, les N-glycannes sont pris en charge par les mannosidases qui hydrolysent jusqu'à 5 résidus de mannoses. Dans le Golgi médian, des β -GlcNAcT participent à la mise en place des antennes des glycannes de type complexe. Dans le trans-Golgi, des monosaccharides terminaux comme le fucose et l'acide sialique sont liés aux différentes antennes afin d'achever la maturation des glycannes (Moremen *et al.*, 2012).

Par contre, après l'hydrolyse effectuée par la MAN2, le glycanne $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_3$ est reconnu par la N-acétylglucosaminyl transférase II (MGAT2). La MGAT2 forme le $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_4$ et permet la biosynthèse des N-glycannes de type complexe. A partir de là, différentes N-acétylglucosaminyl transférases participent à la formation des antennes. Chez l'homme, les enzymes MGAT4A, MGAT4B et MGAT5 permettent la biosynthèse des glycannes portant trois ou quatre antennes (Schachter, 1986). Chez la souris, il a également été montré la présence de transcrits codant la MGAT6 capable de former une cinquième antenne en β 1-4 du mannose lié en α 1-3 (Brockhausen *et al.*, 1989; Nairn *et al.*, 2008).

Après fixation des différents résidus de GlcNAc, *FUT8*, une α 1-6 fucosyltransférase, transfère un résidu de fucose au niveau du C6 de la GlcNAc liée à l'asparagine avant le passage vers le trans-Golgi. Dans ce dernier compartiment, les antennes achèvent leur élongation par fixations successives de Gal et de GlcNAc. Les extrémités terminales des glycanes sont ensuite susceptibles d'être la cible d'enzymes telles que les sialyltransférases et les fucosyltransférases, ajoutant des unités d'acides sialiques et de fucoses. Les sucres terminaux entrent dans la composition d'épitopes glucidiques spécifiques, comme le Lewis X ou Sialyl-Lewis X (Figure 4).

Des travaux plus récents ont montré qu'il pouvait exister des structures particulières nommées paucimannose. Ces structures paucimannosidiques sont formées des deux premiers résidus de GlcNAc, de 1 à 3 résidus de mannose et d'un résidu de fucose lié en α 1-6 sur le premier résidu de GlcNAc. Ces structures ont notamment été décrites comme régulatrices dans la prolifération de cellules neurales progénitrices (Dahmen *et al.*, 2015).

II - La O-Glycosylation de type mucine chez les mammifères

A – Présentation

La O-glycosylation est une modification retrouvée sur les glycoprotéines au niveau des résidus de sérine et thréonine. Il existe de nombreux types de O-glycosylation qui se différencient par la nature du monosaccharide lié à la partie protéique incluant la O-fucosylation, la O-mannosylation, la O-xylosylation ou encore la O-N-acétylglucosaminylation. Nos études ont uniquement porté sur les O-glycanes de type mucine qui sont liés de manière covalente par un résidu de N-acétylgalactosamine (GalNAc) à un groupement -OH d'un des deux acides aminés hydroxylés par une liaison O-glycosidique. Dans la suite de ce manuscrit, le terme O-glycane réfèrera uniquement aux O-glycanes de type mucine.

Les mucines sont des glycoprotéines exprimées à la surface de la plupart des épithéliums, comme par exemple ceux du tractus intestinal ou encore pulmonaire (Hollingsworth and Swanson, 2004). Elles participent à la formation du mucus et également à la protection des épithéliums. Elles sont fortement glycosylées car elles possèdent une multitude de sites de O-glycosylation. Les O-glycanes portés par les mucines modulent la viscosité du mucus,

notamment par la présence ou non d'acide sialique, et protègent l'épithélium de l'environnement et des agents pathogènes (Linden *et al.*, 2008). Contrairement à la *N*-glycosylation, la biosynthèse des *O*-glycannes est un mécanisme cellulaire exclusivement golgien. Elle se divise cependant également en trois étapes d'initiation, d'élongation et de terminaison.

B - Biosynthèse des *O*-glycannes chez les mammifères

La biosynthèse des *O*-glycannes est initiée par le transfert d'un résidu de GalNAc à partir d'UDP-GalNAc sur une sérine ou une thréonine, par l'action d'une polypeptide-*N*-acétylgalactosaminyltransférase (ppGalNAcT) au niveau du cis-Golgi. Des études *in silico* ont révélé qu'il y aurait près de 24 ppGalNAcT humaines (Hagen *et al.*, 2003). Cependant, à ce jour, seules 12 ppGalNAcT de mammifères ont été clonées et exprimées de manière fonctionnelle. Les *O*-glycannes portés par les mucines débutent tous par un résidu de α -*N*-acétylgalactosamine pour former l'antigène Tn.

Les *O*-glycannes sont composés d'un noyau sur lequel se greffent différents monosaccharides, et notamment des sucres terminaux (acide sialique, fucose) qui forment des épitopes glucidiques spécifiques. Huit types de noyaux ont été identifiés pour les *O*-glycannes, dont 4 majoritaires (type 1, 2, 3 et 4) et 4 minoritaires (type 5, 6, 7 et 8) (Figure 5).

Le noyau de type 1, ou antigène T, est le plus courant et est composé de Gal β 1-3GalNAc-. Il est obtenu après l'action de la C1GalT. Le noyau de type 2, également très courant, est constitué d'un antigène T sur lequel est greffé un résidu de GlcNAc en β 1-6. Ces deux noyaux sont retrouvés dans la majorité des glycoprotéines, mucines ou non, dans divers types cellulaires.

A l'inverse les noyaux de types 3 et 4 sont plutôt retrouvés au niveau des épithéliums. Le noyau de type 3 est composé d'un résidu de GlcNAc lié en β 1-3 de l'antigène Tn grâce à l'action de la C3GnT. Comme pour le noyau de type 2, le type 4 correspond à l'addition d'un résidu de GlcNAc en β 1-6 du noyau de type 3 (Figure 5).

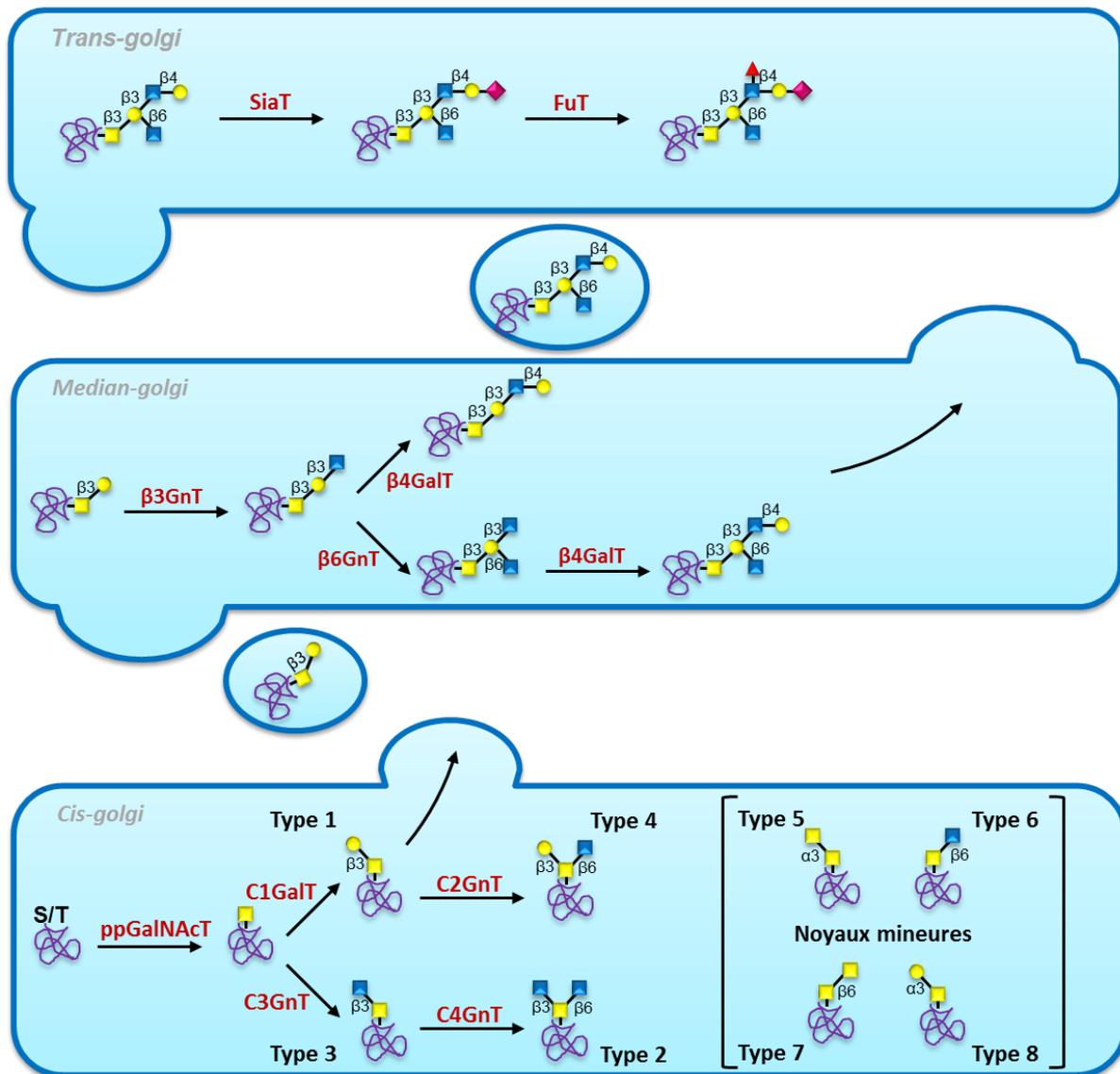


Figure 5 - Biosynthèses des O-glycannes de type mucine.

L'initiation de la biosynthèse des O-glycannes se fait au niveau du cis-Golgi où les différents noyaux sont synthétisés. Les protéines synthétisées, nouvellement O-glycosylées, vont migrer vers le Golgi-médian dans lequel les O-glycannes sont allongés. Pour finir, ils migrent vers le trans-Golgi pour l'étape de terminaison et la liaison des différents oses terminaux (Ju *et al.*, 2013).

Une fois la synthèse du noyau effectuée, les protéines O-glycosylées migrent vers le Golgi-médian où, comme dans le cas des N-glycannes, une étape d'élongation peut avoir lieu. L'élongation consiste en l'ajout successif de résidus de galactose et de GlcNAc pour donner des motifs LacNAc soit de type 1 (Gal β 1-4GlcNAc) soit de type 2 (Gal β 1-3GlcNAc).

Les motifs LacNAc ainsi formés peuvent subir l'étape de terminaison au niveau du trans-Golgi, à l'instar des N-glycannes. Des résidus d'acides sialique et de fucose peuvent se lier aux O-glycannes et former des épitopes glucidiques de type Lewis X ou Sialyl-Lewis X.

III – Les Glycosphingolipides

A – Présentation

Les glycosphingolipides (GSLs) sont les glycolipides les plus abondants au sein des cellules de mammifères. Ils sont présents au niveau de la membrane plasmique, où ils peuvent atteindre un taux de plus de 80% des glycoconjugués, notamment dans les cellules nerveuses (Fukuda *et al.*, 2005). Les glycosphingolipides sont formés d'une partie lipidique, le céramide, insérée dans la membrane plasmique et d'une partie glycanique, exposée au milieu extracellulaire.

Chez les mammifères, le céramide est généralement une sphingosine liée par une liaison amide à une chaîne d'acide gras. La nature de la sphingosine dépend du nombre d'atomes de carbone et du nombre de groupements hydroxyles qui la composent. Par exemple, la sphingosine (d18 :1) est composée de deux groupements hydroxyles pour « d », de 18 atomes de carbone et d'une insaturation au niveau du C4 et C5. La nature des acides gras liés varie en fonction du nombre de carbone et du degré d'insaturation (Iwabuchi *et al.*, 2008, 2015a; Santinha *et al.*, 2012).

Il a été montré, dans des études de lipidomique, que les céramides des cellules immunitaires portaient préférentiellement des acides gras de type acide palmitique (C16 : 0), acide lignocérique (C24 : 0) et acide nervonique (C24 : 1) (Iwabuchi *et al.*, 2008; Yohe *et al.*, 2001). Tout cela réuni, on obtient une grande diversité structurale des glycolipides, indépendamment de la structure oligosaccharidique (Figure 6).

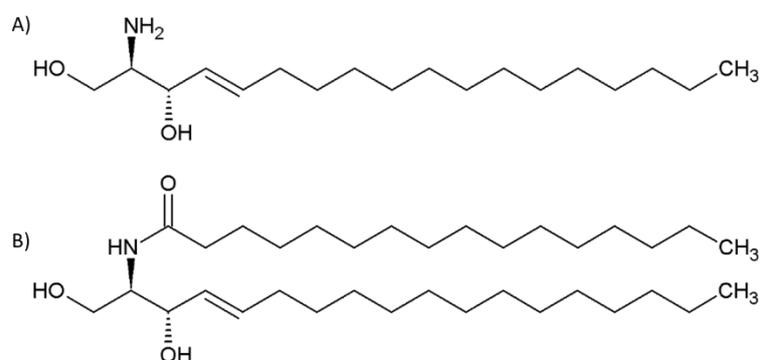


Figure 6 - Structure de sphingosine et de céramide

Molécule de sphingosine (d18:1) (A) couplée à un acide palmitique pour donner le céramide (d18:1 - C16:0) (B).

Cependant, la classification des glycosphingolipides dépend uniquement de la composition de la partie glycanique. Les glycosphingolipides peuvent être divisés en deux classes principales, en fonction du premier monosaccharide lié au céramide : le galactose formant le galactosylcéramide (GalCer) ou le glucose donnant le glucosylcéramide (GlcCer). Les glycosphingolipides composés uniquement d'un seul résidu osidique sont des cérébrosides.

Le GalCer est le premier glycosphingolipide qui a été identifié, puisqu'il est le plus abondant au niveau du cerveau. Il joue un rôle essentiel dans le maintien structural et fonctionnel de la myéline. Le GalCer peut être sialylé en α 2-3 et donner du GM4 (Neu5Ac α 2-3Gal β 1-O-Cer) que l'on retrouve également au niveau de la myéline (Podbielska *et al.*, 2011). Les galactolipides sont rarement composés de plus de deux résidus osidiques ; les glycosphingolipides à longues chaînes sont généralement des dérivés du glucosylcéramide.

Le glucosylcéramide est présent dans bon nombre de tissus et types cellulaires, car il participe à la biosynthèse des autres familles de glycosphingolipides. Le résidu de glucose est généralement substitué par un résidu de galactose en β 1-4 pour donner le lactosylcéramide (LacCer ; Gal β 1-4Glc β 1Cer). Au niveau du lactosylcéramide se greffent d'autres résidus d'oses, pour former les différents « noyaux » correspondants aux familles de glycosphingolipides (Tableau 1).

Famille	Structure	Abréviation
Ganglio	GalNAc β 1-4LacCer	Gg ₃ Cer
Globo	Gal α 1-4LacCer	Gb ₃ Cer
Isoglobo	Gal α 1-3LacCer	iGb ₃ Cer
Lacto	Gal β 1-3GlcNAc β 1-3LacCer	Lc ₄ Cer
NeoLacto	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3LacCer	nLc ₄ Cer

Tableau 1 - Noyaux des différentes familles de glycosphingolipides chez les mammifères

Dans le cadre de mon projet, nous nous sommes particulièrement intéressés aux glycosphingolipides de la famille des gangliosides et des globosides. Les gangliosides sont connus pour intervenir dans de nombreux processus biologiques, grâce aux interactions que peuvent former les résidus d'acides sialiques qu'ils portent.

B – Biosynthèse des gangliosides

1 – Synthèse du céramide

La première étape dans la formation des glycosphingolipides est la formation du squelette lipidique, composé du céramide. La synthèse *de novo* du céramide est réalisée au niveau de la face cytosolique du réticulum endoplasmique. Elle débute grâce à la sérine palmitoyltransférase qui condense une sérine avec un palmitoylCoA, pour produire le 3-kéto-sphinganine (Pralhada Rao *et al.*, 2013). Celle-ci est ensuite réduite par l'action de la 3-kéto-sphinganine réductase pour donner la sphinganine. La sphinganine, ou di-hydro-sphingosine, est ensuite *N*-acylée par un acide gras sous l'action de la Céramide Synthase. Il existe six céramides synthases chez les mammifères, avec des affinités différentes envers les acides gras. Par exemple, les Céramide Synthases 5 et 6 ont une affinité plus forte pour l'acide palmitique (Lahiri and Futerman, 2005; Mizutani *et al.*, 2005).

Une fois l'acide gras lié à la sphinganine, le di-hydro-céramide est obtenu et peut être désaturé par l'action de la Δ^4 -désaturase, qui crée une double liaison entre les carbones C4 et C5 (Ternes *et al.*, 2002), et donne ainsi le céramide (Figure 7). Mais plus généralement, le terme de « céramide » est employé pour les formes saturées ou insaturées. Une fois synthétisé, le céramide migre du RE vers le cis-Golgi, par l'intermédiaire de la protéine CERT (Céramide Transfer Protein) (Hanada *et al.*, 2003). Dans l'appareil de Golgi, le céramide peut être orienté vers la voie de biosynthèse des glycosphingolipides complexes.

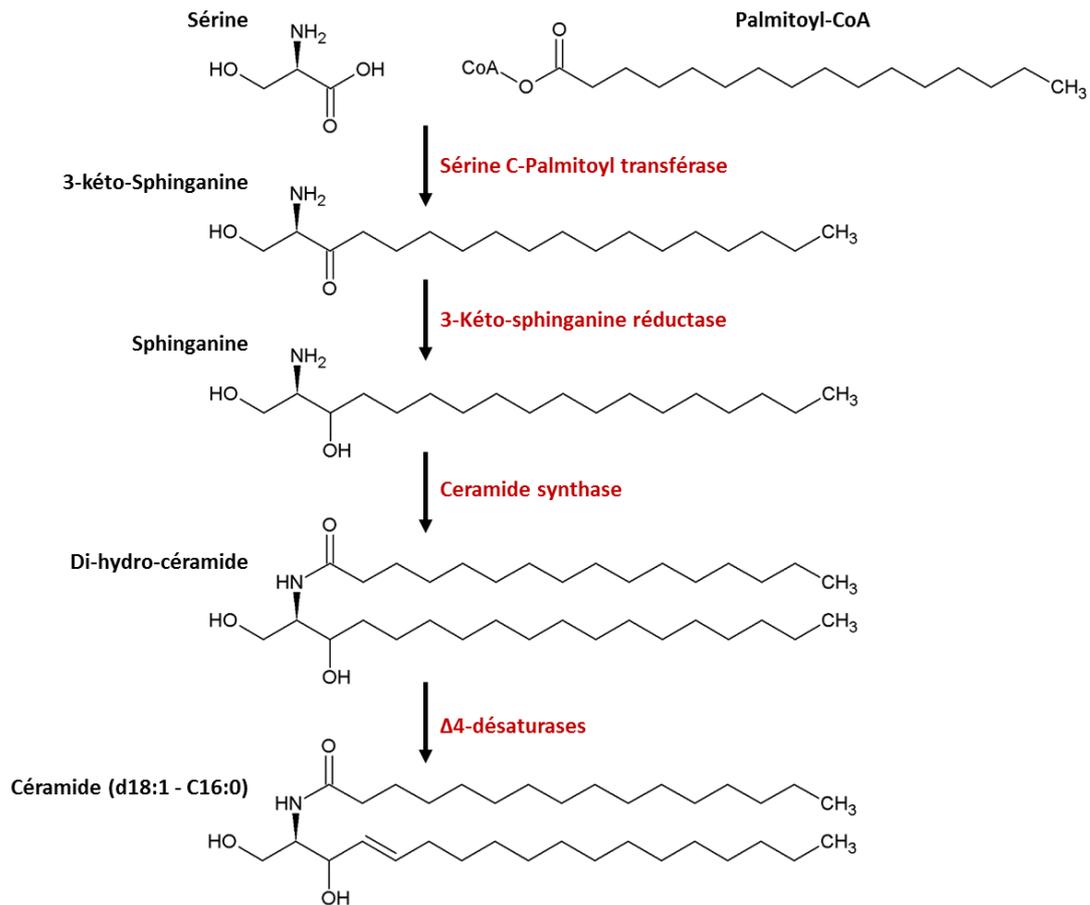


Figure 7 - Biosynthèse de novo du céramide (d18:1 - C16:0) chez les mammifères.

2 – Synthèse des gangliosides

Une fois transféré vers l'appareil de Golgi, le céramide peut participer à la formation de glycosphingolipides, de sphingomyéline ou de galactosylcéramide. Dans le cas des glycosphingolipides, la première étape est de fixer un résidu de glucose par l'intermédiaire de l'UGCG (UDP-Glucose Ceramide Glucosyltransferase) au niveau de la face cytoplasmique de l'appareil de Golgi pour générer le glucosylcéramide (GlcCer) (Figure 8).

Le GlcCer bascule ensuite vers la lumière de l'appareil de Golgi pour les autres étapes de glycosylation. La première étape golgienne est la synthèse de lactosylcéramide (LacCer), qui consiste en l'addition d'un résidu de β galactose en position 1-4 du glucose. Cette réaction est catalysée par la β 4GalT6, ou lactosylcéramide synthase. Le LacCer est un carrefour métabolique dans la voie de biosynthèse des différentes familles de glycosphingolipides.

Pour entrer dans la voie des gangliosides, le LacCer est pris en charge par la ST3Gal5 (GM3 synthase) et donne du GM3. Le GM3 peut être ensuite converti en GD3 et GT3 par l'action de deux autres sialyltransférases : ST8Sia1 (GD3 synthase) et ST8Sia5 (GT3 synthase). Les structures sialylées GM3, GD3 et GT3 sont les précurseurs des séries a-, b- et c- des gangliosides (Svennerholm, 1980).

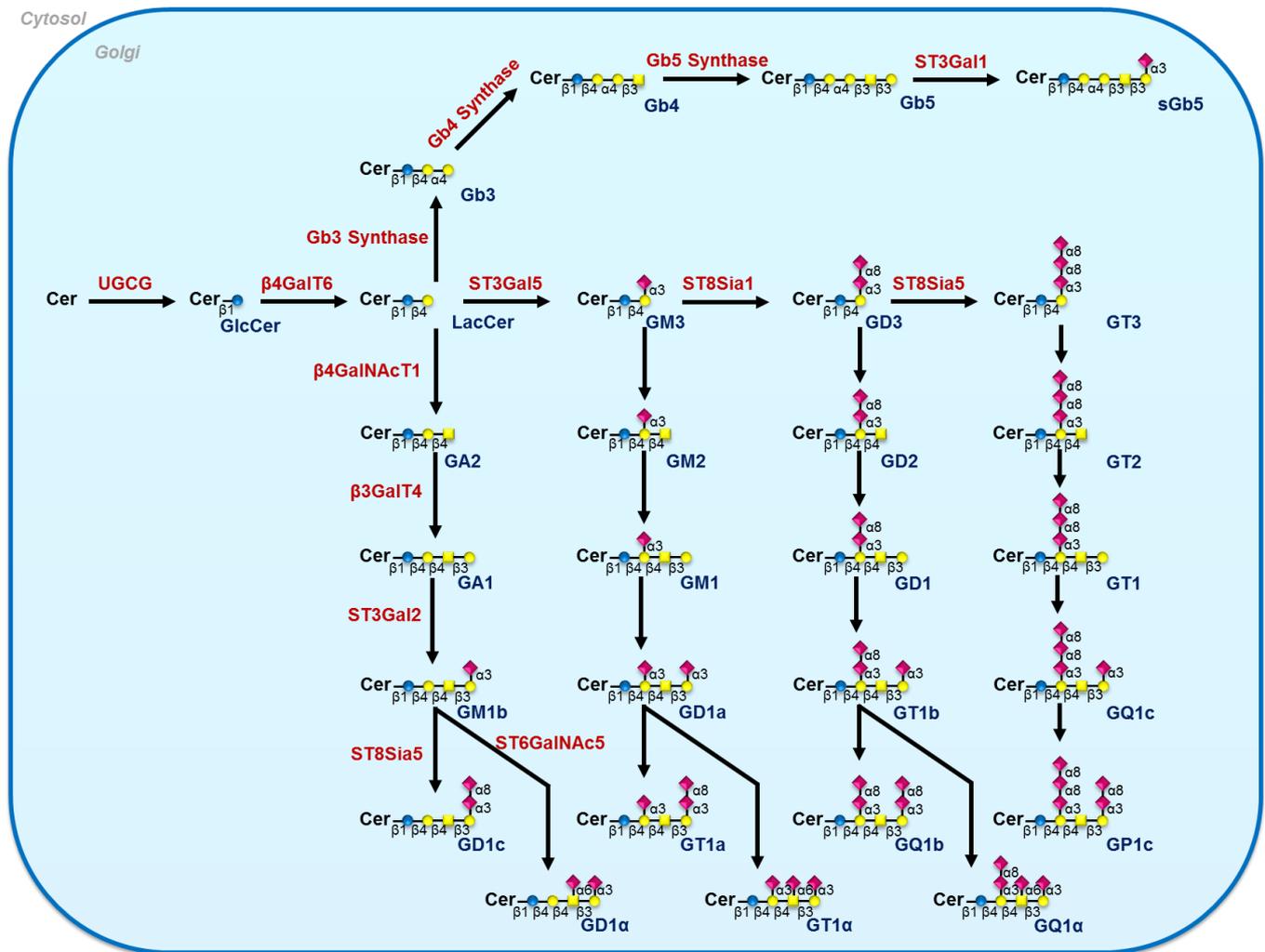


Figure 8 - Biosynthèse des glycosphingolipides de la famille des gangliosides et des globosides chez les mammifères

Les synthèses des gangliosides et des globosides débutent à partir de lactosylcéramide. Les gangliosides sont synthétisés par les actions successives de la ST3Gal5, de la ST8Sia1 et de la ST8Sia5 pour donner respectivement le GM3, le GD3 et le GT3. L'élongation de la chaîne neutre se fait par l'action de la β4GalNAcT1 et de la β3GalT4. Ensuite, les activités de ST3Gal2, de ST8Sia5 et de ST6GalNAc5 donnent des gangliosides multi- et poly-sialylés. Les gangliosides sont nommés selon la nomenclature de Svennerholm (Svennerholm, 1980).

Une autre série de gangliosides émerge également du LacCer, la série o-, qui conduit à la formation de gangliosides non-sialylés, comme le GA2 et GA1. A partir de chaque série, les

actions successives de *N*-acétylgalactosyltransférases, de galactosyltransférases et de sialyltransférases participent à la formation des différents gangliosides.

IV – Diversité Structurale et épitopes glucidiques

Que ce soit pour les *N*-glycannes, *O*-glycannes ou encore les glycosphingolipides, un noyau commun aux différents types de glycannes est toujours retrouvé. Mais à partir de ce noyau commun se forment des motifs glucidiques spécifiques que l'on peut retrouver sur l'ensemble des structures décrites précédemment.

L'addition des antennes ou des sucres terminaux est souvent un mécanisme régulé en fonction du type cellulaire ou encore des tissus. Des variations structurales interviennent également dans les phénomènes d'activation, de différenciation cellulaire, mais sont aussi associées à des processus de cancérisation. Ces modifications structurales sont directement liées à la régulation d'expression des différentes glycosyltransférases (Ho *et al.*, 2016; Kizuka and Taniguchi, 2016).

A – Unités de type 1 et de type 2

Lors de leur maturation, les glycannes exposent à leurs extrémités des résidus de *N*-acétylglucosamine qui peuvent être substitués par un résidu de galactose. Ce résidu de galactose peut être lié en β 1-3 et générer une unité de type 1, composée du disaccharide Gal β 1-3GlcNAc, nommée également motif néo-*N*-acétyllactosamine (Figure 9).

Mais plus couramment, le résidu de galactose est lié par la β -GlcNAc en 1-4 (Gal β 1-4GlcNAc) et donne une unité de type 2, appelée aussi motif *N*-acétyllactosamine (LacNAc). Dans le cas des unités de type 2, le résidu de galactose peut être substitué par un autre résidu de GlcNAc en β 1-3, qui à son tour recevra un autre résidu de galactose en β 1-4, formant ainsi deux unités de LacNAc. La répétition des motifs LacNAc va contribuer à la formation de poly-*N*-acétyllactosamine [Gal β 1-4GlcNAc]_n (Figure 9).

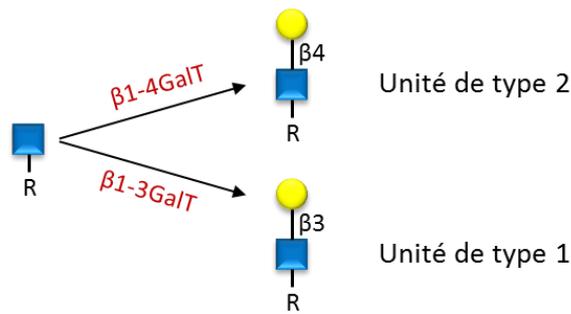


Figure 9 - Représentation schématique des unités lactosaminiques de type 1 et de type 2

B – Motifs poly-*N*-acétyllactosamine

Les chaînes de poly-*N*-acétyllactosamine (poly-LacNAc) peuvent être portées aussi bien par les *N*-Glycannes, *O*-Glycannes ou encore glycosphingolipides. Comme écrit précédemment, les poly-LacNAc sont constitués de la succession de motifs Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc. Les motifs poly-LacNAc sont branchés sur des unités de type 2 (Kannagi *et al.*, 1985). Leur synthèse est directement régulée par l'action des β 1-4-galactosyltransférases et des β 1-3-*N*-acetylglucosaminyltransférases (Figure 10). Cependant, il a été montré que dans des adénocarcinomes de côlon, les unités de type 1 pouvaient également servir de sites accepteurs dans la formation de motif poly-LacNAc (Fan *et al.*, 2008).

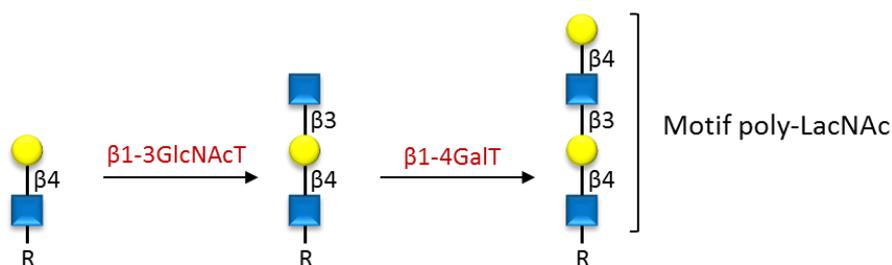


Figure 10 - Représentation schématique d'un motif poly-*N*-acétyllactosamine

Les motifs LacNAc ou poly-LacNAc servent de substrats accepteurs pour des réactions de glycosylation ultérieures, dont principalement la fucosylation et la sialylation. De par leur nature linéaire, les chaînes poly-LacNAc peuvent servir d'échafaudage pour la présentation d'épitopes terminaux spécifiques, dont les fonctions nécessitent d'être présentées à une certaine distance de la membrane plasmique.

C – Epitopes glucidiques de type Lewis et de Type ABH

Lors de la maturation golgienne des glycanes, les motifs lactosaminiques peuvent servir de squelette à la formation d'épitopes glucidiques spécifiques. Parmi les différentes structures possibles, il y a les épitopes glucidiques de type ABH et de type Lewis. La synthèse de ces épitopes commence sur un précurseur glycanique composé d'un β -galactoside terminal.

Les motifs lactosaminiques sont les substrats accepteurs dans la formation des épitopes de groupes sanguins ABH. Ces antigènes sont liés aussi bien sur des unités de type 1 ou de type 2 et sont retrouvés au niveau des *N*-glycanes, *O*-glycanes et glycolipides (Dotz and Wuhrer, 2016; Wiczyńska *et al.*, 1980). De plus, la synthèse des épitopes sanguins peut se faire sur d'autres types de précurseurs. Il existe les motifs de type 3 [Gal β 1-3GalNAc α 1-R] et les motifs de type 4 [Gal β 1-3GalNAc β 1-R]. Le motif de type 3 est exclusivement retrouvé au niveau des *O*-glycanes, car il correspond au noyau de type 1. Le motif 4 est retrouvé au niveau des glycolipides, des globosides et des gangliosides (Le Pendu *et al.*, 2001).

La formation des antigènes sanguins commence par le transfert d'un résidu de fucose en α 1,2 du galactose terminal pour donner les antigènes H, catalysé par l'action de deux α 1,2-fucosyltransférases, *FUT1* et *FUT2* (Kelly *et al.*, 1995; Larsen *et al.*, 1990). Une fois formé, l'antigène H peut être le précurseur des antigènes A et B. L'antigène A est formé par l'ajout d'un résidu de *N*-acétylgalactosamine en α 1,3 du résidu de galactose terminal catalysé par la A-transférase. L'antigène B est formé à partir de l'antigène H sur lequel la B-transférase fixe un résidu de galactose en α 1,3 (Figure 11) (Cooling, 2015).

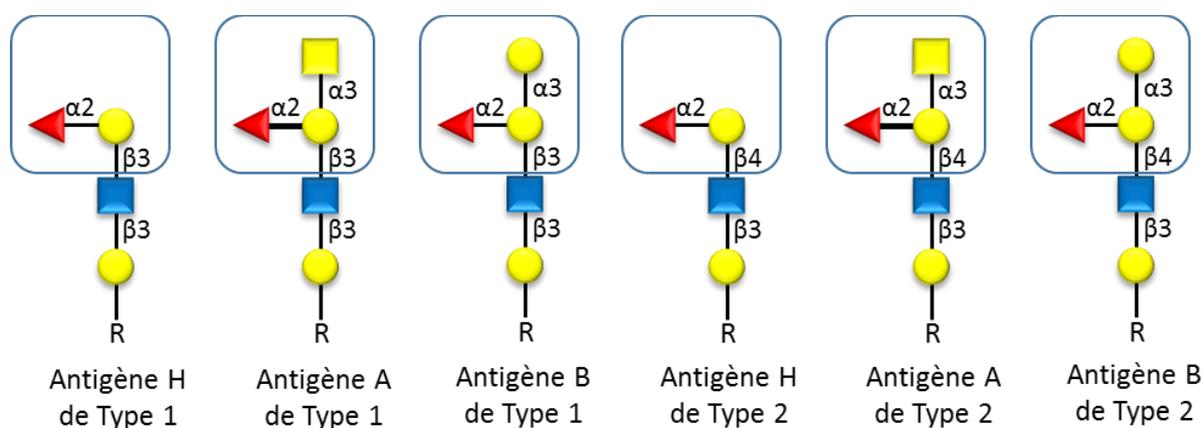


Figure 11 - Représentation des épitopes sanguins du système ABH

Au niveau de l'antigène H, le résidu de *N*-acétylglucosamine peut être substitué par un second résidu de fucose. L'ajout de ce résidu de fucose en α 1-3 ou en α 1-4 sur un antigène H va donner respectivement un motif Lewis Y ou Lewis B. Par contre, l'ajout de ce résidu de fucose en α 1-4 ou en α 1-3 sur des motifs lactosaminiques donne respectivement les motifs Lewis A et Lewis X (Figure 12).

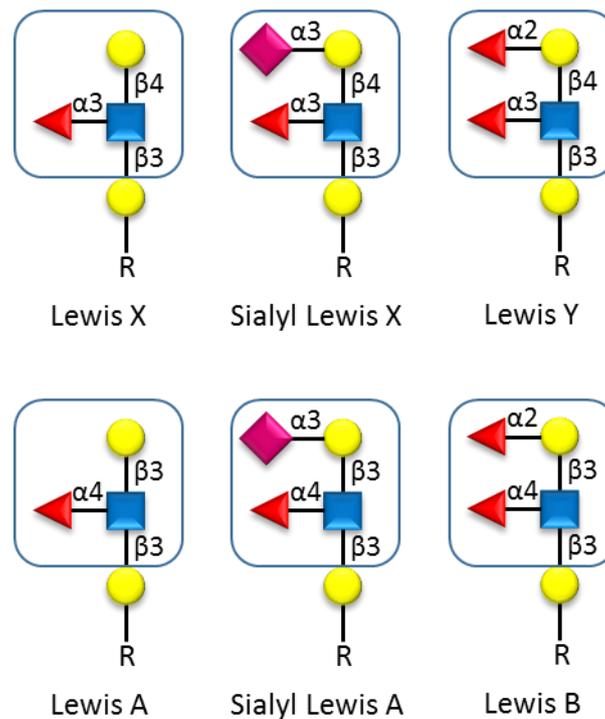


Figure 12 - Représentation schématique des différents motifs de type Lewis.

Les enzymes impliquées dans cette biosynthèse sont des α 1,3- et α 1,4-fucosyltransférases. Les fucosyltransférases impliquées dans la biosynthèse de Lewis X sont les α 1,3-fucosyltransférases. *FUT3* et *FUT5* sont capables de catalyser l'addition d'un résidu de fucose en α 1,3 ou α 1,4 et peuvent utiliser les unités de type 1 et 2 comme substrats, *FUT3* ayant une préférence pour le type 1 et *FUT5* pour le type 2. *FUT4*, *FUT6*, *FUT7*, *FUT9*, *FUT10* et *FUT11* catalysent l'addition d'un résidu de fucose en α 1,3 exclusivement sur les unités de type 2 (Brockhausen, 2014; Mollicone *et al.*, 2009; Sperandio *et al.*, 2009).

On retrouve également ces motifs sous une forme sialylée, avec liaison d'un résidu d'acide sialique en position α 2-3 sur le galactose terminal catalysée par une α 2-3-sialyltransférase, pour donner le Sialyl Lewis X ou Sialyl Lewis A. Il existe six α 2-3-sialyltransférases répertoriées chez l'homme. La *ST3Gal1* et la *ST3Gal2* agissent préférentiellement sur les unités de type 3 et 4. La *ST3Gal3* et la *ST3Gal4* fixent l'acide sialique sur les unités de type 1 et 2, avec une

préférence pour le type 1 pour la *ST3Gal3* et le type 2 pour la *ST3Gal4*. Précédemment, nous avons vu que la *ST3Gal5* permettait la synthèse du GM3 (Carvalho *et al.*, 2010; Harduin-Lepers *et al.*, 2001).

Les différentes étapes de sialylation et de fucosylation nécessaires à la formation de ces épitopes s'effectuent toujours dans un ordre bien précis. Chez les mammifères, une structure α 2-fucosylée ne pourra pas être α 2,3-sialylée et inversement. Par ailleurs, l' α 1,2-fucosylation est réalisée avant l' α 3/4-fucosylation lors de la synthèse des épitopes di-fucosylés de type Lewis Y et Lewis B.

D – La sulfatation

En principe, tous les groupements hydroxyles présents libres d'un monosaccharide sont susceptibles d'être sulfatés. Cependant chez les mammifères, la sulfatation des glycanes se limite au résidu de galactose, de *N*-acétylglucosamine, de *N*-acétylgalactosamine et d'acide glucuronique. Cette réaction est principalement connue pour intervenir dans la biosynthèse des glycosaminoglycannes comme les héparanes sulfates, les kératanes sulfates ou encore les chondroïtines sulfates.

Mais la réaction de sulfatation n'est pas exclusive à ce type de molécule. En effet, les épitopes glucidiques de type Lewis peuvent être également sulfatés. Des groupements sulfates sont retrouvés au niveau de la position 3 des motifs de type Lewis A et Lewis X et donnent respectivement le 3'-Sulfo-Lewis X et 3'-Sulfo-Lewis A (Figure 13).

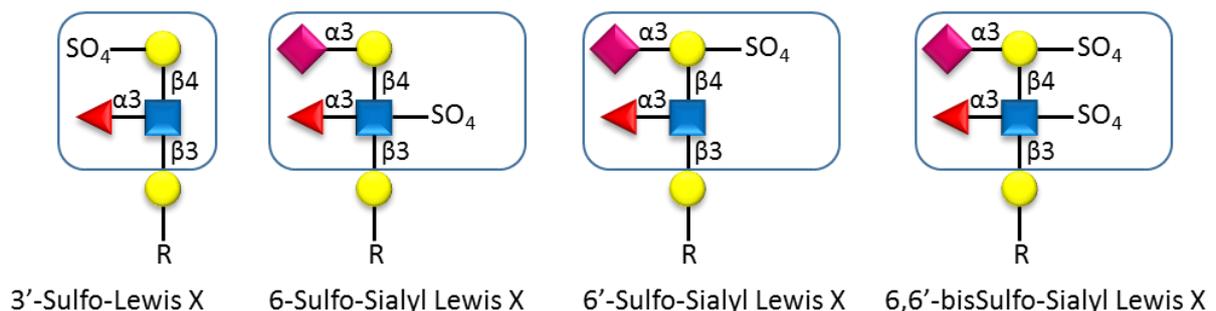


Figure 13 - Représentation des différents degrés de sulfatation du motif Lewis X

Au niveau des épitopes Lewis sialylés, des groupements sulfates sont retrouvés soit au niveau de la position 6 du résidu de GlcNAc, soit en position 6 du galactose terminal. Le Sialyl Lewis X sulfaté sur la position 6 du galactose donne le 6'-Sulfo-Lewis X, par contre s'il est sulfaté en

position 6 du résidu de GlcNAc il donne le 6-Sulfo-Lewis X. Additionnées, ces deux modifications génèrent le 6,6'-bisSulfo-Sialyl Lewis X.

Le transfert d'un groupement sulfate sur la position 6 du résidu de GlcNAc est réalisé par des GlcNAc-6-sulfotransférases (GlcNAc6ST). La GlcNAc6ST-1 (ou CHST-2) et la GlcNAc6ST-2 (CHST-4) sont impliquées dans la sulfatation des *N*- et *O*-glycannes (Groux-Degroote *et al.*, 2008b; Grunwell and Bertozzi, 2002; Tobisawa *et al.*, 2010; Yoshimura *et al.*, 2017). La sulfatation en 6 du galactose est effectuée par la KSGal6ST (ou CHST-1) et la C6ST. Ces deux enzymes ont été initialement décrites comme responsable respectivement de la sulfatation des chondroïtines et kératanes sulfates, mais elles sont finalement capables de sulfater aussi les motifs lactosaminiques (Habuchi *et al.*, 1997; Torii *et al.*, 2000).

V – Conclusion

Dans ce chapitre, nous venons de mettre en avant la grande diversité structurale des *N*-glycannes, *O*-glycannes et GSLs. La formation des différents motifs présentés est dépendante de l'expression des glycosyltransférases impliquées dans cette biosynthèse. Leurs expressions sont dépendantes du type cellulaire, de l'environnement cellulaire mais également inflammatoire.

Comme pour les différentes classes de macromolécules, les glycannes ont un impact sur un large spectre de fonctions biologiques indispensables au développement, à la croissance et à la survie des organismes qui les synthétisent (Varki, 2016). Dans la biosynthèse réticulaire, les *N*-glycannes sont impliqués dans le bon repliement des protéines néo synthétisées au niveau du réticulum endoplasmique et dans le maintien de la bonne mise en conformation de celles-ci. En effet, si certaines protéines présentent un défaut de glycosylation, le repliement conformationnel n'est pas correctement effectué ce qui empêche les protéines de suivre la voie de sécrétion golgienne, mais sont plutôt orientées vers la voie de dégradation du protéasome (Xu and Ng, 2015).

Une fois les protéines sécrétées, les glycannes sont principalement présents au niveau de la membrane plasmique des cellules. Ils peuvent aussi bien avoir une fonction de régulation des récepteurs de la membrane mais également de protection des cellules. Au niveau des différents épithéliums, les *O*-glycannes liés aux mucines sécrétées vont former une barrière mécanique capable de protéger l'épithélium de l'environnement extérieur. Les motifs

présents sur ces structures glycaniques vont également être engagés dans des interactions avec différents micro-organismes (Tailford *et al.*, 2015).

Les glycanes portés au niveau des endothéliums des différents tissus vont servir de point d'ancrage dans l'adhérence et le recrutement cellulaire. Lors d'une inflammation, des médiateurs de l'inflammation tels que les chimiokines induisent l'expression de molécules d'adhésion telle que ICAM-1 à la surface de l'endothélium. Ces molécules d'adhésion portent différents glycanes avec à leur extrémité, des épitopes glucidiques spécifiques de type Lewis par exemple qui peuvent servir de substrat à des récepteurs appelés des sélectines. (Sperandio *et al.*, 2009). Cette étape de recrutement fait partie des premières étapes lors de la mise en place de la réponse immunitaire. Dans le troisième chapitre, nous allons voir l'importance de la glycosylation dans la régulation des principales fonctions immunologiques, après avoir présenté les principaux acteurs de l'immunité innée.

Chapitre 2 : Les Macrophages et les cellules dendritiques dans l'immunité innée

L'ensemble des protéines majeures présentes au niveau de la membrane cellulaire et des protéines sécrétées sont glycosylées, à l'exception de la β 2-microglobuline et de l'albumine (Rudd *et al.*, 2001). La glycosylation module directement la mise en conformation des protéines, leur sécrétion et influe une multitude de fonctions cellulaires. Comme nous l'avons développé précédemment, il existe une impressionnante diversité structurale de la glycosylation au niveau des cellules de mammifères. Pour un même site de glycosylation, le nombre de structures potentielles est illimité et permet, par conséquence, de réguler la fonction de la protéine cible.

Au niveau du système immunitaire, l'ensemble des protéines sont des glycoprotéines que ce soit des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR ou Pattern Recognition Receptor) comme les TLRs (Toll Like Receptor), les CLR (C-Type Lectin Receptors) ou encore les protéines du complexe majeur d'histocompatibilité des type I et II (CMH I et CMH II) ou bien des récepteurs aux cytokines. En plus des protéines membranaires, les protéines sécrétées comme les cytokines ou encore les immunoglobulines sont également glycosylées.

Dans cette partie, nous allons tout d'abord présenter de manière succincte l'organisation du système immunitaire et ensuite décrire plus en détails le rôle de certains acteurs du système immunitaire inné : les macrophages et les cellules dendritiques.

I – Présentation générale du système immunitaire

Le système immunitaire est une machinerie cellulaire complexe dont le but est de détecter et d'éliminer de l'organisme tout élément qui pourrait être nuisible comme les pathogènes. Il peut être divisé en deux grandes lignes de défense : l'immunité innée (ou non-spécifique) et l'immunité adaptative (ou acquise). Les microorganismes que nous rencontrons tous les jours peuvent, pour une partie d'entre eux, provoquer des pathologies. En général, la grande majorité est reconnue et détruite dans les minutes ou les heures qui suivent l'infection par l'immunité innée. Il s'agit d'une réponse immunitaire aspécifique et sans mémoire. Dans un

second temps, l'immunité adaptative induit une réponse spécifique, dépendante d'antigènes propres aux pathogènes. Cette réponse a la capacité de mémoriser une exposition à un antigène, permettant à l'hôte de mettre en place une réponse immunitaire plus rapide et efficace lors d'une infection ultérieure par le même pathogène.

A – L'immunité innée

L'immunité innée constitue le premier rempart de l'organisme contre des agents pathogènes. Les cellules épithéliales des différents tissus forment une barrière cellulaire entre l'organisme, l'environnement et les microorganismes ambiants. Cependant, cette barrière n'est pas infranchissable et des agents infectieux ont la capacité de la traverser et ainsi initier l'infection. Suite à l'entrée des pathogènes, la première étape dans la réponse immunitaire est la détection de l'agent infectieux. Les cellules de l'immunité innée reconnaissent ces agents via les PRRs ou récepteurs de connaissance de motifs moléculaires. Ces récepteurs sont localisés soit au niveau de la membrane plasmique, soit au niveau du cytoplasme des cellules de l'immunité innée. Les PRRs vont lier les PAMPs (pathogens-associated molecular patterns) et les DAMPs (danger-associated molecular patterns). Les PAMPs sont définis comme des motifs moléculaires associés à des groupes de pathogènes et qui induisent une réponse pro-inflammatoire ou antimicrobienne par les cellules de l'immunité innée. Les DAMPs sont des molécules de l'hôte qui agissent comme des signaux de danger (Takeuchi and Akira, 2010; Thompson *et al.*, 2011).

Les PRRs peuvent être classés en trois catégories distinctes : les PRRs solubles, membranaires et intracellulaires :

- Les PRRs sécrétés ou solubles sont des molécules qui fixent les pathogènes soit pour permettre leur opsonisation et leur phagocytose, soit pour les détruire directement. Les PRRs les plus étudiés sont les MBLs (Mannose Binding Lectin) qui reconnaissent les motifs mannosylés présents sur les parois des pathogènes et qui induisent leur phagocytose, la LBP (LPS Binding Protein) protéine liant le LPS pour améliorer la réponse inflammatoire, ou encore la CRP (C Reactive Protein) responsable de l'activation du complément (Litvack and Palaniyar, 2010).

- Les PRRs membranaires tapissent les membranes des cellules de l'immunité et sont impliqués dans la phagocytose et la réponse inflammatoire. Parmi ces PRRs, les TLRs représentent la famille la plus connue. Ils permettent la synthèse de cytokines inflammatoires, de chimiokines et l'augmentation de l'expression de molécules de co-stimulation (Kawasaki and Kawai, 2014). En plus des TLRs, les PRRs membranaires comprennent les récepteurs au mannose qui sont des récepteurs de phagocytose et les récepteurs scavengers. Ces récepteurs lient les lipoprotéines oxydées qui véhiculent le cholestérol destiné à être éliminé par phagocytose et jouant un rôle dans la clairance des corps apoptotiques (Kerrigan and Brown, 2009).

- Les PRRs intracellulaires plus récemment découverts sont composés quant à eux des récepteurs de type NLR (NOD-like receptors) capables de lier des ligands comme le peptidoglycane (PGN) (Caruso *et al.*, 2014), ou de type RLR (RIG-I-like receptors) impliqués dans la reconnaissance d'ARN virale (Loo and Gale, 2011), régulant la réponse inflammatoire et apoptotique. L'activation de ces récepteurs conduit à l'activation des voies de signalisation qui induisent la synthèse de cytokines inflammatoires ainsi que la maturation des cellules présentatrices d'antigènes faisant ainsi un lien avec l'immunité adaptative.

Cette reconnaissance des PAMP par les PRRs conduit à l'activation des voies de signalisation dans le but de produire les différents médiateurs de l'inflammation, de permettre la migration cellulaire et la présentation des différents antigènes. Parmi les types cellulaires de l'immunité innée, on retrouve des cellules phagocytaires telles les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques (DC) ou encore les neutrophiles. Ce système est également composé de lymphocytes comme les cellules NK (natural killer), les cellules NKT (natural killer T) et les lymphocytes T $\gamma\delta$. En plus d'être des cellules phagocytaires, les monocytes, macrophages et DCs sont aussi de puissantes cellules présentatrices d'antigènes (CPA) et font le pont entre les immunités innées et adaptatives. Les CPAs sont considérées ainsi grâce à leur capacité d'internaliser les pathogènes, d'apprêter et présenter les antigènes aux cellules T via les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH).

B – L'immunité adaptative

Malgré une réponse de l'immunité innée, il arrive que le pathogène échappe à cette première ligne de défense. Ainsi, afin de reconnaître et d'éliminer sélectivement les pathogènes, une

seconde forme d'immunité existe, connue sous le nom d'immunité adaptative, dépendante de l'immunité innée, qui se met en place quelques jours après l'infection initiale. Contrairement à l'immunité innée, la réponse adaptative est spécifique du pathogène qui l'a induite. Cette réponse constitue une seconde ligne de défense qui permet d'éliminer les pathogènes qui ont échappé à la réponse innée ou qui persistent malgré cette réponse (Gasteiger and Rudensky, 2014).

Suite à un stimulus bactérien, les CPA vont présenter les antigènes microbiens aux cellules T CD4 naïves, résidentes des tissus lymphoïdes. Lors d'une primo infection, les CPA arborent des molécules de CMH de type II (CMH II) afin de « présenter » l'antigène au récepteur des cellules T (TCR). Cette stimulation antigénique induit l'activation et la prolifération des lymphocytes effecteurs qui se distinguent par leur production de cytokines et leurs fonctions.

En 1986, Mosmann *et al.* ont décrit deux sous populations de lymphocytes T CD4 chez la souris. Ces deux sous populations de lymphocytes sont nommés lymphocytes T helper 1 (Th1) et T helper 2 (Th2) (Mosmann *et al.*, 1986).

Cette polarisation des lymphocytes T CD4 est dépendante des signaux d'activation reçus lors de la réponse immunitaire. Suite à une exposition à l'IL-12, les cellules T CD4 se différencient en lymphocytes Th1 et vont sécréter des cytokines à caractère pro-inflammatoire comme de l'interféron gamma (IFN γ), du TNF α (tumeur necrosis factor alpha) et de l'IL-2. Tandis que pour se différencier en lymphocytes Th2, les cellules T CD4 doivent être exposées à de l'IL-4 ou de l'IL-13 et sécréteront des cytokines anti-inflammatoires de type IL-4, IL-5, IL-10 et IL-13 (Zhu *et al.*, 2010). En 2003, une troisième population majeure de lymphocytes T helper dérivée de cellules T CD4 naïves a été démontrée. Ces cellules, appelées lymphocytes Th17, ont été caractérisées comme sécrétrices d'IL-17A, d'IL-17F et d'IL-22, cytokines non produites par les cellules Th1 ou Th2. Leur différenciation est induite par l'action conjointe de l'IL-6 et du TGF- β .

Les cytokines sécrétées par les lymphocytes Th1 activent les fonctions bactéricides des macrophages et peuvent détruire les cellules infectées et participent à la génération de lymphocytes T cytotoxiques. Celles sécrétées par les lymphocytes Th2 aident à l'activation des lymphocytes B, conduisant à la production d'anticorps. Les cellules Th17 sont également de bons producteurs d'IL-21, bien que l'IL-21 puisse être produite par des cellules Th2 (Figure 14)

(Harrington *et al.*, 2005). Les lymphocytes Th17 vont recruter les neutrophiles dans les cas d'infections bactériennes (Curtis and Way, 2009). Les lymphocytes T cytotoxiques (CTL) ou T CD8 sont obtenus après activation de pré-CTL par deux signaux. Le premier signal correspond à la présentation d'antigène par les CPA via le CMH I. Ensuite, ils doivent être activés par les cytokines sécrétées par les lymphocytes Th1, de type IL-2 et INF- γ . Ces deux signaux réunis vont pouvoir différencier et activer les CTLs dans le but de lyser les cellules qui arborent l'antigène cible (Huang *et al.*, 2007).

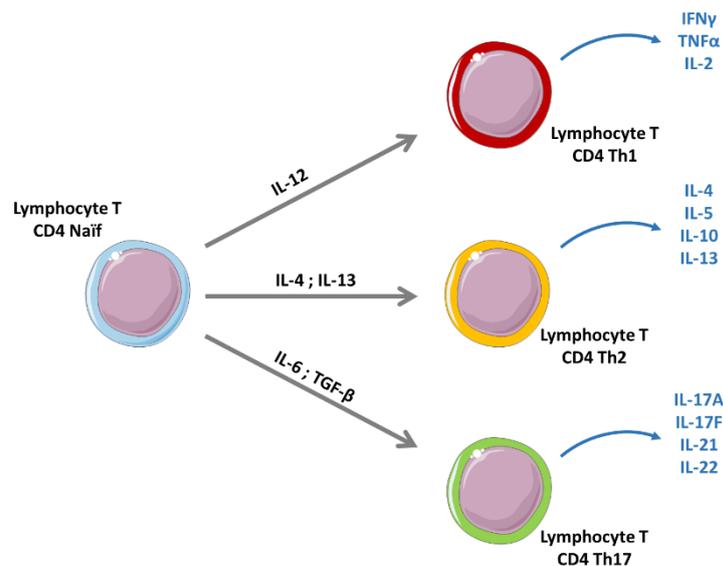


Figure 14 – Polarisation des lymphocytes T CD4

Les cellules lymphocytes T CD4 naïfs se différencient en lymphocytes T auxiliaires, Th1, Th2 ou Th17 en fonctions de l'environnement inflammatoire et de la nature des cytokines présentes. De ces polarisations résultent une sécrétion spécifique de cytokines pour chaque type cellulaire (Zhu *et al.*, 2010).

Il existe une quatrième voie de différenciation des lymphocytes T CD4 qui donne les lymphocytes T régulateurs (Treg). Les Treg sont divisés en deux groupes : les Treg CD25⁺ qui expriment le facteur de transcription Foxp3 (Forkhead box protein 3) et les Treg inducibles (iTreg) par le TGF- β mais également par l'IL-10 et l'IFN- γ (Vignali *et al.*, 2008). Les Treg présentent un phénotype anti-inflammatoire, notamment via la sécrétion d'IL-10 et de TGF- β (Josefowicz *et al.*, 2012)

II – Les Sentinelles du Système Immunitaire inné : les macrophages et les cellules dendritiques

Les macrophages et les cellules dendritiques sont considérés comme les sentinelles du système immunitaire car ce sont des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) qui participent à la mise en place de l'immunité adaptative. Ces deux types cellulaires sont issus d'un même précurseur : les monocytes. Comme les macrophages et les cellules dendritiques, les monocytes sont des cellules phagocytaires mononuclées. Les monocytes sont issus des cellules souches hématopoïétiques (HSCs) de la moelle osseuse. Ces HSCs vont ensuite se différencier en précurseur myéloïde (MP) et ensuite en monocytes (Figure 15).

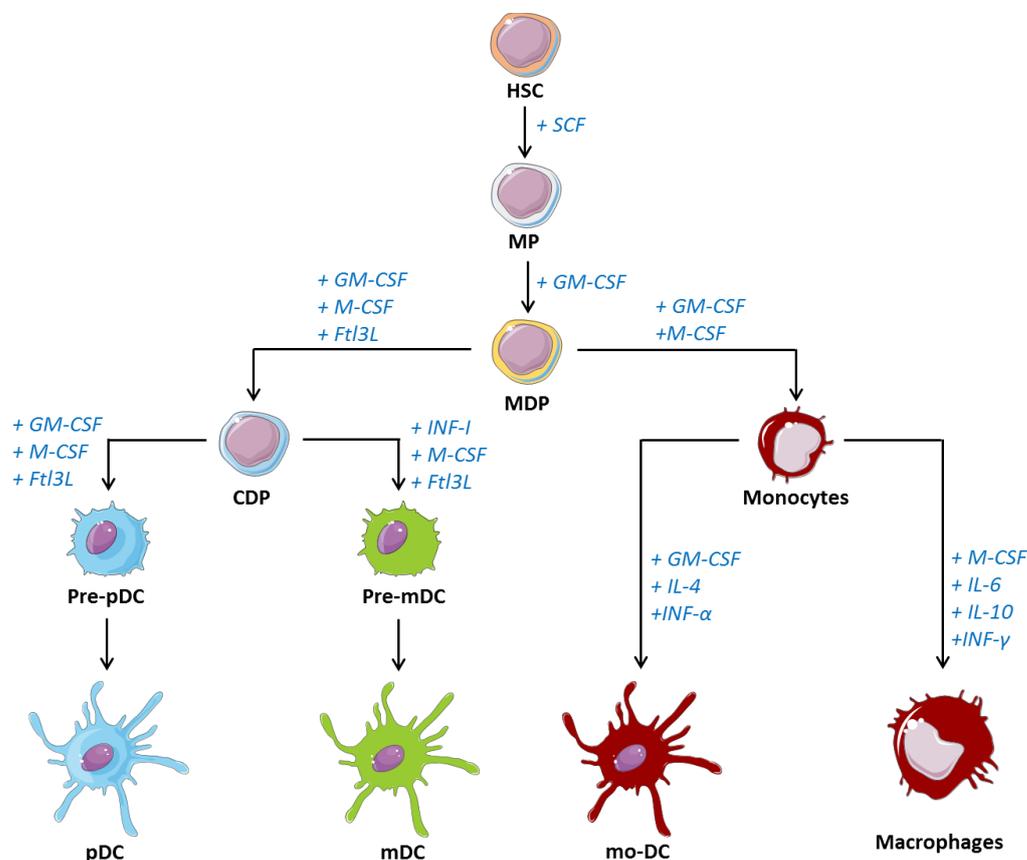


Figure 15 - Différenciation des cellules dendritiques et des macrophages.

Dans la moelle osseuse, les cellules souches hématopoïétiques (HSCs ; hematopoietic stem cells) vont donner des précurseurs myéloïdes (MPs). Les MPs donnent naissance par la suite aux MDPs (monocyte macrophage, and DC precursors). Les MDPs vont devenir ensuite soit des monocytes, soit des précurseurs des cellules dendritiques (CDPs). Les CDPs donnent ensuite des pré-cellules dendritiques plasmacytoïdes (pre-pDC) ou des pré-cellules dendritiques myéloïdes (pre-mDC). Grâce à la circulation sanguine, les pré-pDC et les pré-mDC vont rejoindre les organes lymphoïdes et les différents tissus où elles deviendront des cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) et des cellules dendritiques myéloïdes (mDC). Les monocytes rejoignent eux aussi la circulation sanguine et les tissus lymphoïdes ou non lymphoïdes. Arrivés aux tissus, les monocytes vont donner des macrophages ou des cellules dendritiques dérivés de monocytes (mo-DC) (Geissmann *et al.*, 2010).

Après 24h dans la moelle osseuse, les monocytes sont libérés dans la circulation sanguine et migrent, à l'état basal ou en réponse à une inflammation, dans les tissus pour se différencier en macrophages ou en cellules dendritiques (Geissmann *et al.*, 2010).

A – Les Macrophages

Comme décrit précédemment, les macrophages sont des cellules mononuclées originaires de la moelle osseuse, différenciées à partir de monocytes. Les macrophages dérivent en général des monocytes sanguins dans un environnement inflammatoire. Ces cellules participent à de nombreux mécanismes physiologiques et pathologiques au niveau des tissus. Ces cellules phagocytaires sont responsables de la clairance de cellules apoptotiques, de la production de facteurs de croissance, du remodelage tissulaire, de la réparation et de la résolution de la réponse inflammatoire (Gordon and Martinez-Pomares, 2017). Lors d'une réponse inflammatoire, par exemple au cours d'une infection ou en cas de lésions cellulaires, les cytokines sécrétées dans l'environnement tissulaire induisent la polarisation des macrophages. Les macrophages sont divisés en deux populations distinctes, les macrophages classiques de type M1 activés par l'interféron γ (INF- γ) et les macrophages alternatifs de type M2 activés par l'IL-4 et l'IL-13. A l'origine, l'expression « activation des macrophages » était utilisée pour définir les macrophages ayant acquis une activité microbicide (Figure 16) (Gordon, 2003).

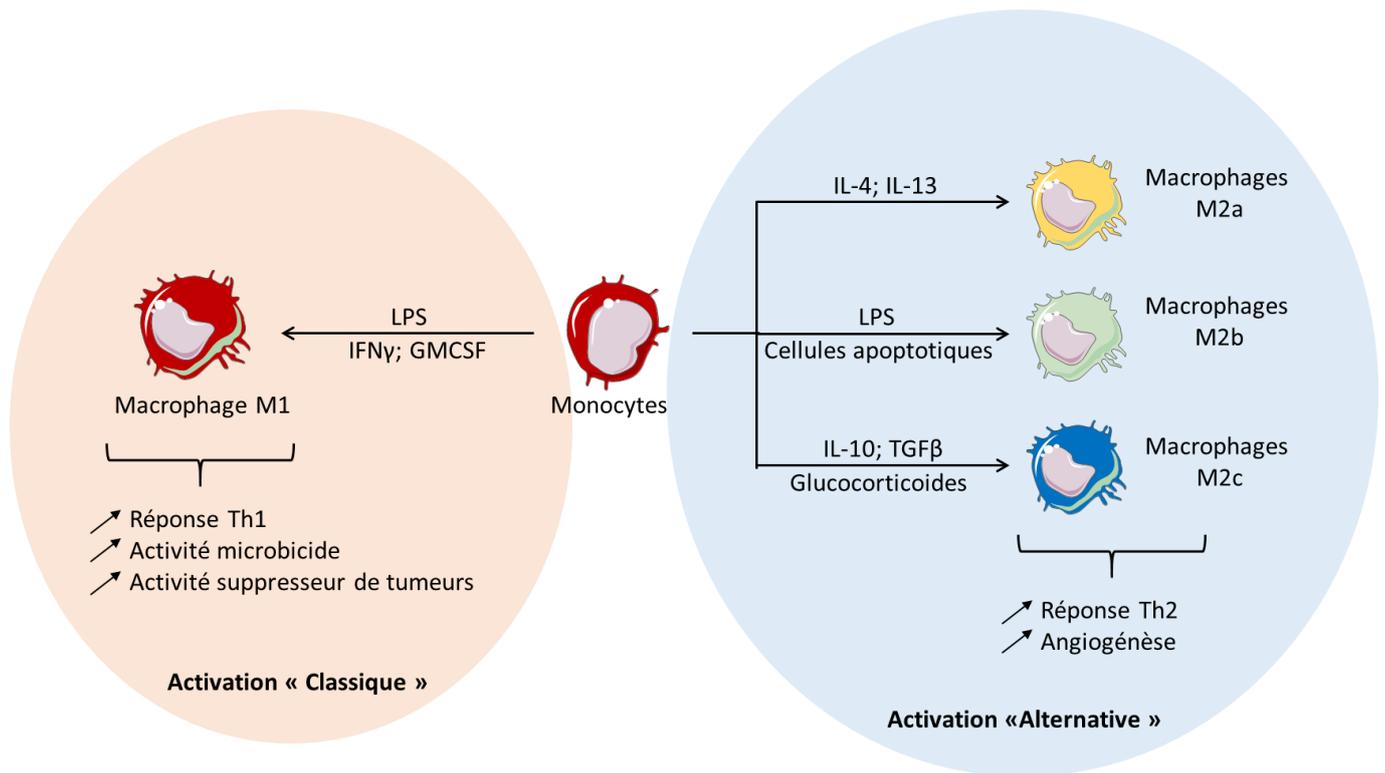


Figure 16 - Polarisation des macrophages

Les stimuli de l'environnement définissent la polarisation différentielle des macrophages par l'activation classique (M1) ou l'activation alternative (M2). Le LPS dérivé des pathogènes, seul ou en association avec l'IFN- γ , conduit à une activation « classique » de type M1. Cette activation conduit à une activité pro-inflammatoire et microbicide plus importante. L'activation alternative des macrophages est divisée en trois sous-populations. La différenciation M2a est encouragée après stimuli par l'IL-4 ou l'IL-3, et cette sous-population est associée à la réponse Th2, au processus d'allergie, à l'internalisation et à la destruction des parasites. L'activation M2b est liée à la présence des complexes immuns associés aux ligands des TLRs. Les glucocorticoïdes et la sécrétion d'IL-10 conduisent à la différenciation en macrophage M2c, et conduit au remodelage et la réparation tissulaire (Arango Duque and Descoteaux, 2014).

1 – Les Macrophages M1

L'orientation des macrophages vers le type M1 est définie comme une activation par la voie « classique ». Cette polarisation M1 est dépendante de l'exposition à des cytokines telle l'IFN- γ (Interferon gamma), associée à un stimulus microbien tel que le LPS ou à des cytokines comme le TNF- α (Tumor necrosis factor alpha) ou le GM-CSF (Granulocyte macrophage colony stimulating factor) (Martinez *et al.*, 2006). L'IFN- γ est produit par les macrophages après une interaction entre les pathogènes et les PAMPs, notamment au niveau des TLRs. Le LPS, ligand du TLR-4, est le signal d'activation de la polarisation M1 le plus couramment utilisé (Martinez and Gordon, 2014). La production d'IFN- γ induit l'expression de gènes codant pour des récepteurs aux cytokines (IL2RA ; IL6R), des marqueurs d'activations (CD36 ; CD38 ; CD69 ;

CD97) ou encore des molécules d'adhésion cellulaire (ICAM-1 ; CD11a ; SIAT1) (Raggi *et al.*, 2017; Waddell *et al.*, 2010). Cette activation des macrophages M1 est spécifique aussi au niveau des protéines sécrétées ensuite par la cellule. L'activation des TLRs aboutit à la production de grandes quantités de cytokines comme IL-12, IL-23, IL-6, IL-1 β , TNF α , caractéristiques d'une réponse Th1, et des molécules du CMH de type 2 et de marqueurs de surface tels que le CD86 et CD80 (Figure 17). En parallèle, il y a une production importante de radicaux oxygénés (ROS) par la NADPH oxydase. De plus, l'activation par les TLRs induit l'expression de iNOS (inducible nitric oxide synthase), qui a pour conséquence la production de NO (nitric oxide) impliqué dans la destruction des pathogènes intracellulaires.

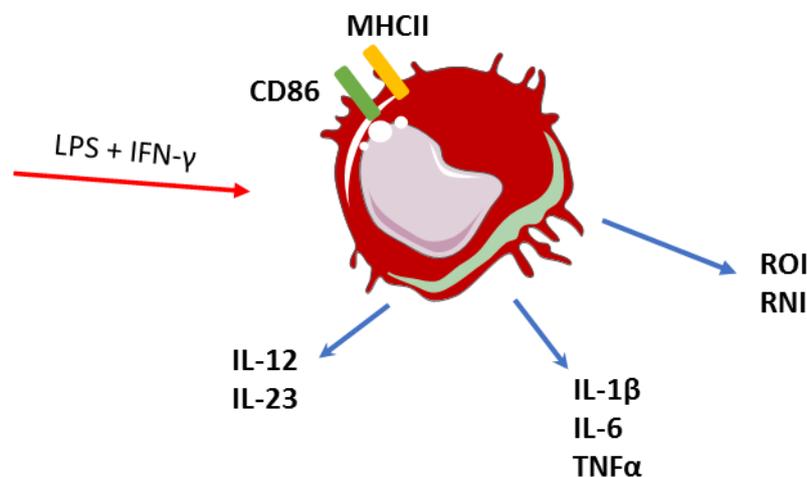


Figure 17 – Phénotypes des macrophages M1

Les macrophages M1 présentent de fait une activité cytotoxique importante envers les pathogènes intracellulaires. Indispensable pour la défense de l'organisme, l'activation des macrophages peut aboutir, via les cytokines et les radicaux oxygénés produits, à des dommages tissulaires importants (Galván-Peña and O'Neill, 2014; West *et al.*, 2011). De ce fait, les macrophages M1 sont impliqués dans la pathogénicité des maladies auto-immunes comme la polyarthrite rhumatoïde, des maladies inflammatoires intestinales, mais aussi dans le cancer (Lissner *et al.*, 2015; Mantovani *et al.*, 2017; Udalova *et al.*, 2016).

2 – Les Macrophages M2

Les macrophages de type M2 sont à l'origine des macrophages qui ne suivent pas l'activation « classique ». Ces dernières années, une nomenclature des différentes activations M2 plus détaillée a été avancée, basée sur les signaux activateurs. Cette nomenclature permet de

distinguer les macrophages M2 en trois classes : M2a, M2b et M2c (Figure 16 ; Figure 18). Le sous-type M2a est défini comme des macrophages alternatifs activés, le M2b comme des macrophages de type 2 et le M2c comme des macrophages désactivés (Biswas and Mantovani, 2010).

Les macrophages M2a sont des macrophages ayant été exposés soit à l'IL-4 soit à l'IL-13 ; ce qui définit la voie d'activation « alternative » (Gundra *et al.*, 2014). Ces deux cytokines sont produites par des cellules de l'immunité innée (cellules NK, mastocytes...) et des cellules de l'immunité adaptative (lymphocytes Th2). De ce fait, l'activation alternative a besoin de deux signaux, l'activation par les PAMPs et la stimulation à l'IL-4. Les PRRs activent les PAMPs et induisent le recrutement des cellules de l'immunité innée productrices d'IL-4 ou d'IL-13. Ce signal permet le développement d'une différenciation Th2 qui va, comme pour l'activation classique, permettre la mise en place d'une activation alternative des macrophages plus intense. De plus, les cytokines IL-4/13 et les PAMPs peuvent agir en synergie pour stimuler la sécrétion d'IL-10 de macrophages, qui constitue un signal pour la répression de la réponse Th1 (Edwards *et al.*, 2006; Mantovani *et al.*, 2004). Cette production de cytokines anti-inflammatoires s'accompagne d'une surexpression de l'arginase-1, enzyme qui réduit la production de NO à partir d'iNOS en limitant la disponibilité d'arginine intracellulaire ce qui entraîne une atténuation des lésions inflammatoires et une suppression de la clairance du pathogène intracellulaire (Yang and Ming, 2014). Les macrophages M2a vont arborer différents marqueurs de surface comme le CD206, dont l'expression est augmentée par l'IL-4 (Figure 19) (Martinez-Pomares *et al.*, 2003).

Les macrophages M2b sont induits par les complexes immuns associés aux ligands des TLRs. Ce premier signal est dépendant de l'environnement et de la réponse inflammatoire. Ces macrophages sont de grands producteurs d'IL-10 et peu d'IL-12, ce qui a pour but de contrer la réponse Th1 (Mantovani *et al.*, 2004). Ils conservent alors leurs propriétés anti-inflammatoires malgré leur capacité à produire des cytokines pro-inflammatoires (TNF, IL-1 et IL-6) et sont responsables de la protection contre la toxicité au LPS (Figure 18). Ces macrophages sont impliqués dans l'activation des lymphocytes Th2 mais aussi dans les mécanismes d'immunorégulation (Mosser, 2003).

Les macrophages M2c sont des macrophages qui produisent beaucoup d'IL-10, et de prostaglandines de type PGE2. On les retrouve notamment dans un environnement riche en

cellules apoptotiques, et la présence de glucocorticoïdes dans l'environnement facilite leur polarisation (Figure 18).

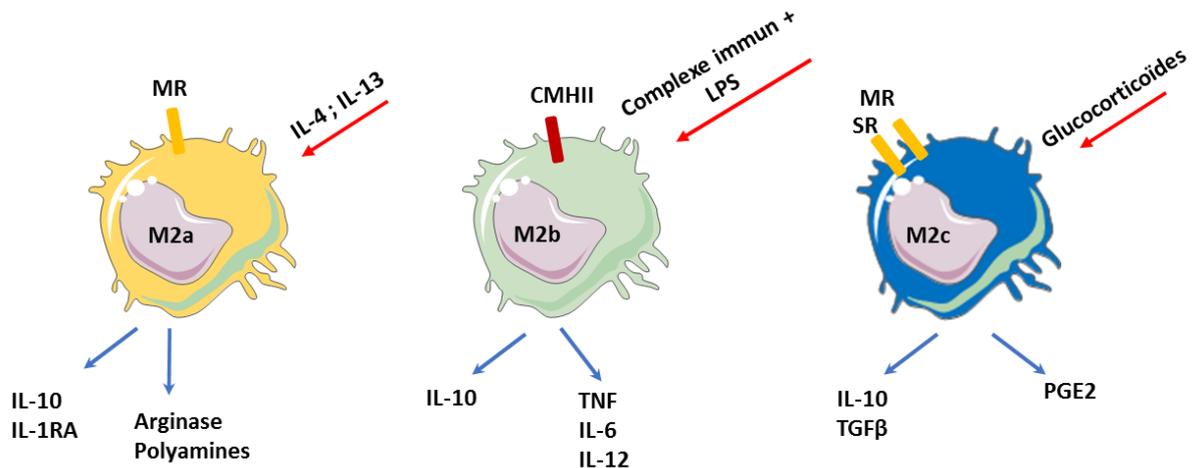


Figure 18 – Phénotypes des différents macrophages M2

L'ensemble des macrophages M2 sont producteurs d'IL-10 car il s'agit d'une cytokine anti-inflammatoire qui inhibe la production des cytokines pro-inflammatoires. Et contrairement aux macrophages M1, on ne retrouve que très peu de molécules du CMH II au niveau des M2 car leur synthèse est inhibée par l'IL-10 (Chadban *et al.*, 1998).

B – Les cellules dendritiques

Comme les macrophages, les cellules dendritiques sont également des CPAs. Néanmoins elles sont plus efficaces et appelées CPAs professionnelles et participent grandement à la mise en place et à la régulation de l'immunité adaptative. De ce fait, elles présentent à leur surface un grand nombre de molécules du CMH I et du CMH II, mais aussi des co-stimulateurs indispensables à la présentation des antigènes tels que le CD80 et le CD86 (Reis e Sousa, 2006). Les cellules dendritiques sont divisées en deux groupes distincts, les cellules dendritiques myéloïdes (mDC) et les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) (Merad *et al.*, 2013).

1 – Les Cellules Dendritiques Myéloïdes

Les mDCs, ou cellules dendritiques classiques, sont les plus majoritaires dans l'organisme. Elles sont obtenues à partir d'un précurseur hématopoïétique CD11c⁺. Elles rejoignent la circulation sanguine sous la forme de pré-cellules dendritiques (pré-DC), avant d'être dirigées vers les tissus où elles seront différenciées en cellules dendritiques immatures. Ces cellules

dendritiques immatures vont, par l'intermédiaire des PRRs présents sur leur membrane, reconnaître les antigènes microbiens, les endocyter pour ensuite les présenter à la membrane via le CMH I ou le CMH II. Chez la souris, le marqueur prédominant des mDCs est le CD11b contrairement au CD11 chez les mDCs humaines. Les mDCs migrent ensuite vers les organes lymphoïdes où elles présentent les antigènes aux lymphocytes T afin d'induire la réponse adaptative.

2 – Les Cellules Dendritiques Plasmacytoïdes

Moins nombreuses que les mDCs, les pDCs sont également issues de la moelle osseuse. Contrairement aux mDCs, les pDCs ne présentent pas de CD11c à leur surface, mais elles expriment d'autres marqueurs spécifiques comme le CD123, CD303 et CD304 (Cao, 2009; Collin *et al.*, 2013).

Les pDCs résident dans les organes lymphoïdes et le sang, et sont capables de synthétiser de grande quantité d'INF- α et d'INF- β en réponse à une stimulation par des acides nucléiques viraux ou bactériens. Cette production est notamment due à la reconnaissance par le TLR7 et le TLR-9, abondants chez les pDCs (Villadangos and Young, 2008).

Malgré que ce soit des cellules dendritiques, l'efficacité de présentation d'antigènes est plus faible pour les pDCs. Elles seraient surtout impliquées dans la présentation d'antigènes viraux, contrairement aux mDCs qui présentent tous types d'antigènes.

III - Les Récepteurs de l'immunité Innée : les principaux PRRs

A – Les Tolls like receptors: TLRs

Les TLRs sont des glycoprotéines transmembranaires de type I. Chez l'homme, dix TLRs différents (TLRs1-10) ont été identifiés, et 12 chez la souris (TLR1-9, TLR11-13). Avec le récepteur à l'interleukine-1 (IL-1R), ils forment la superfamille des TIR (Toll/Interleukine-1 Receptor) car ils partagent une homologie de séquence au niveau du domaine cytoplasmique C-terminal (O'Neill and Bowie, 2007). La partie N-terminale des TLRs est une succession de motifs LRR (Leucine-rich repeat). Cette extrémité N-terminale est directement impliquée dans la reconnaissance des PAMPs. La disposition des différents motifs LRR confère à chaque TLRs

une spécificité de ligands. Le domaine extracellulaire des TLRs contient un motif CRD (Cystein rich domain) puis 19 à 25 copies en tandem de motifs LRR (Figure 19) (Botos *et al.*, 2011).

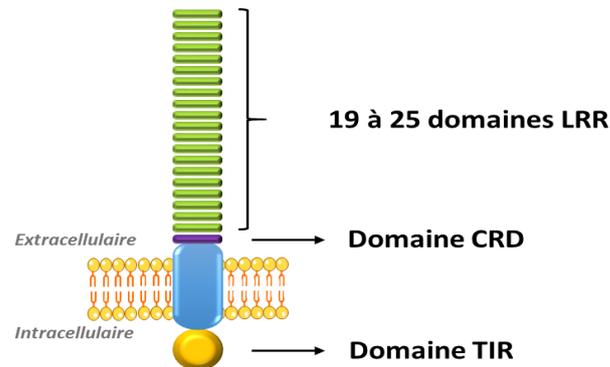


Figure 19 - Représentation schématique de la structure des TLRs.

Les TLRs sont des glycoprotéines membranaires intégrales de type 1. Ils sont composés de répétition de régions riches en Leucine (LRR) impliquées dans la reconnaissance des PAMPs et dans la transduction du signal à travers le TLR. Le domaine TIR (Toll / IL-1R cytoplasmique) va permettre le recrutement de protéines adaptatrices nécessaires à la transduction du signal.

Le domaine LRR des TLRs adopte une forme de fer à cheval, dont la partie concave est impliquée dans la reconnaissance des différents pathogènes. La reconnaissance des différents ligands de TLR peut se faire directement au niveau de cette partie concave, ou indirectement par des corécepteurs comme c'est le cas pour le TLR4 (CD14, LBP). Malgré le haut degré de conservation de ces domaines LRR, les TLRs reconnaissent des motifs structurellement différents.

Les TLRs sont exprimés au niveau de la membrane plasmique des cellules (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 et TLR6) ou au niveau des compartiments cellulaires (TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9). La localisation des TLRs est directement dépendante des ligands qu'ils reconnaissent. Les TLRs localisés au niveau de la membrane plasmique reconnaissent les éléments bactériens présents dans le milieu extracellulaire. Il peut s'agir de composants de la paroi des pathogènes (LPS, peptidoglycane), des facteurs de virulence ou de mobilité. Tandis que les TLRs intracellulaires endosomaux sont impliqués dans la reconnaissance d'acides nucléiques bactériens ou viraux (Tableau 2).

TLR	Principaux Ligands	Références
1/2	Lipoprotéines tri-acylés ; Lipomannane ; Lipoarabinomannane	(Jin <i>et al.</i> , 2007; Nigou <i>et al.</i> , 2001; Vignal <i>et al.</i> , 2003)
2	Peptidoglycane	(Dziarski and Gupta, 2005; Müller-Anstett <i>et al.</i> , 2010)
3	ARN viral double brins	(Alexopoulou <i>et al.</i> , 2001)
4	LPS ; HSP ; MPLA	(Cui <i>et al.</i> , 2014; Fang <i>et al.</i> , 2011; Romero <i>et al.</i> , 2011)
5	Flagelline	(Hayashi <i>et al.</i> , 2001)
2/6	Lipoprotéines di-acylés	(Kang <i>et al.</i> , 2009)
7	ARN viral simple brin	(Diebold <i>et al.</i> , 2004; Larangé <i>et al.</i> , 2009)
8	ARN viral simple brin	(Heil <i>et al.</i> , 2004; Larangé <i>et al.</i> , 2009)
9	ADN bactérie ; ADN viral	(Peter <i>et al.</i> , 2009)

Tableau 2 - Principaux ligands des TLRs humains

De plus, la localisation des TLRs a un rôle important dans la discrimination du « soi » et du « non-soi ». Dans le cas des acides nucléiques, on peut retrouver de l'ADN double brin et des ARN simple brin chez l'homme et chez les pathogènes. Des études ont montré qu'un TLR9 contenant la partie transmembranaire et cytosolique du TLR4 avait la capacité de migrer à la membrane plasmique. Le TLR9 modifié induit une réponse vis-à-vis d'ADN du « soi » alors que l'ADN viral, ligand du TLR9 endogène, n'induit plus de réponse (Barton *et al.*, 2006; Dowling and Mansell, 2016).

La reconnaissance de PAMPs ou de DAMPs par le TLR conduit à l'activation de voies de signalisation qui induisent la synthèse de cytokines, chimiokines et de molécules co-stimulatrices. L'interaction ligand/TLR débute par la dimérisation entre deux chaînes TLR, ce qui provoque un changement conformationnel du récepteur. Le TLR4, pour être fonctionnel, forme un homodimère tandis que le TLR2 forme un hétérodimère avec TLR1 ou TLR6 (Bovijn

et al., 2012; Farhat *et al.*, 2008; Jin *et al.*, 2007). Ce changement de conformation induit un recrutement cytosolique de protéines adaptatrices possédant également un domaine TIR, à savoir TIRAP (TIR domain containing adaptator protein), TRIF (TIR-domain containing adaptor-inducing interferon- β) ou encore TRAM (TIR-domain containing adaptator molecules). En fonction des TLRs, la fixation de ligands et le recrutement des protéines adaptatrices conduisent à l'activation de deux cascades de signalisation telles que la voie MyD88 (Myeloid differentiation primary response gene 88) dépendante ou voie MyD88 indépendante (Wang *et al.*, 2014) (Figure 20).

Dans la voie MyD88 dépendante, la fixation du ligand au niveau du TLR permet le recrutement au niveau du domaine cytoplasmique de la protéine adaptatrice TIRAP grâce à l'interaction de leurs domaines TIR (Figure 20). Une fois TIRAP recrutée, la protéine MyD88 va venir se greffer au complexe. Myd88 interagit ensuite avec la kinase IRAK4 (IL1R Associated Kinase 4), qui phosphoryle IRAK1 et IRAK2. Ces trois protéines se dissocient ensuite de MyD88 pour former le complexe IRAK, qui va ensuite interagir avec une autre protéine, l'ubiquitine ligase TRAF6 (Tumor Necrosis Factor Receptor Associated Factor 6). TRAF6 activée, elle synthétise une chaîne d'ubiquitines libre qui active le complexe composé des protéines TAK1 (TGF- β -activated kinase), TAB1 (TAK1-binding protein), TAB2 et TAB3. Le complexe activé permet la phosphorylation de IKK β (IkB Kinase) et de MAPKK6 (MAPK kinase 6).

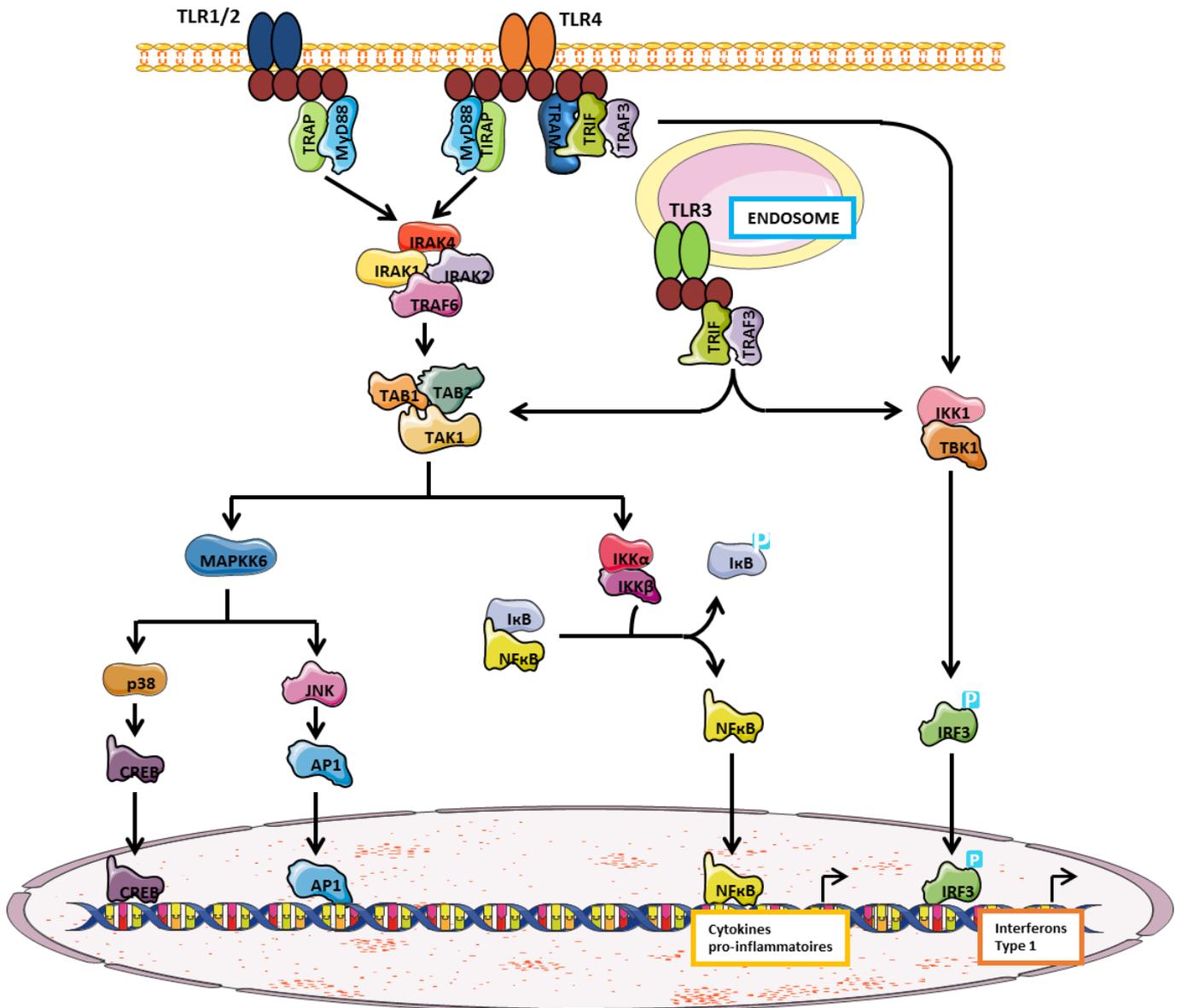


Figure 20 - Activation des voies Myd88 dépendante et indépendante par différents TLRs.

L'activation des TLRs par fixation de leurs différents ligands conduit à la dimérisation des récepteurs et au recrutement des différentes protéines adaptatrices telles que MyD88, TIRAP, TRIF et TRAM. Le recrutement de ces protéines permet l'activation des complexes IRAK et IKK. Ces complexes activent des facteurs de transcription tels que les facteurs NF-κB, CREB, AP1 et IRF3. Ces facteurs vont réguler la production de cytokines pro-inflammatoires et d'interféron de type 1 (IFN-I) (Wang *et al.*, 2014).

D'un côté, IKKβ, sous unité du complexe IKK composé d'IKKα, IKKβ et NEMO (NF-κB essential modulator), phosphoryle la protéine IκBα, inhibiteur du facteur de transcription NF-κB. La phosphorylation de IκBα induit sa dégradation, et permet la translocation du facteur de transcription NF-κB vers le noyau et induit l'expression de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF-α ou l'IL-6.

De l'autre côté, la phosphorylation de MAPKK6 active la voie des MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinase), qui est composée de trois sous-familles, les JNKs (c-Jun-N-terminal Kinase), les ERKs (Extracellular-Regulated Kinase) et les p38. Cette activation est responsable de l'engagement d'un autre facteur de transcription, AP1 (Activator protein 1) qui cible des gènes codants des cytokines inflammatoires. Tous les TLRs à l'exception de TLR3 sont connus pour recruter MyD88 et ainsi déclencher la voie MyD88 dépendante.

La voie MyD88 indépendante conduit à l'activation du facteur de transcription IRF-3 et à la production d'INF- β . Suite à la fixation de ligand, la protéine adaptatrice TRIF se lie à la partie cytoplasmique du TLR-3 et permet le recrutement de TRAF3 et de TRAF6. TRAF6 permet l'activation de la voie NF- κ B et TRAF3 active TBK1 (TANK (TRAF family member-Associated NF-KappaB activator)-Binding Kinase)/IKK-i (Figure 20). Ce complexe TBK1/IKK-i permet la phosphorylation de IRF-3, et donc sa translocation vers le noyau. L'activation de la voie Myd88 indépendante est également possible via le TLR4 avec le recrutement des protéines adaptatrices TRAM et TRIF. Une fois TRIF recrutée, cela active TRAF3 et le complexe TBK1/IKK-i.

B – Le Récepteur à Mannose

Le Récepteur à Mannose (MR) ou CD206 est une glycoprotéine transmembranaire de type 1, et qui fait partie des lectines de type C, ce qui veut dire que l'interaction lectine/glycane est calcium dépendante. Il fait partie de la famille MR, qu'il partage avec ENDO180, DEC205 et PLA2R. Il est exprimé au niveau des cellules dendritiques, des macrophages, mais également au niveau des épithéliums. Il est constitué de trois domaines extracellulaires distincts : le domaine CRD (cystein rich domain) à l'extrémité N-terminale, le domaine FNII (fibronectin type II domain) et huit CTLDs (C-Type lectin domain) (Figure 21) (Martinez-Pomares, 2012; Taylor *et al.*, 2005).

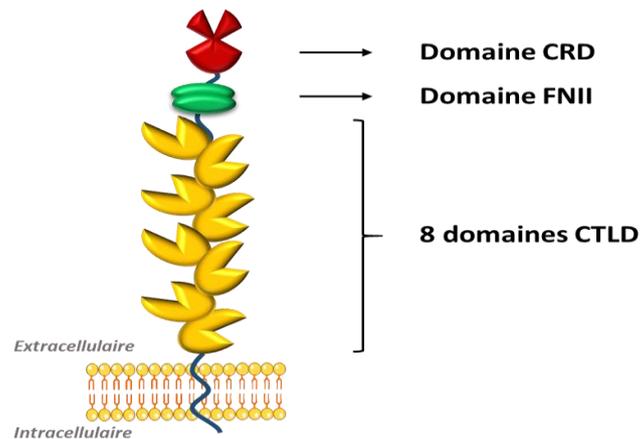


Figure 21 - Représentation schématique de la structure du récepteur à mannose

Le domaine CRD va permettre la liaison de ligands sulfatés, et plus précisément de résidus de galactose ou de GalNAc sulfatés : $SO_4-3s-Gal$ et $SO_4-4/3-GalNAc$ (Fiete *et al.*, 1998; Leteux *et al.*, 2000). Les domaines CTLDs sont impliqués dans la reconnaissance des glycanes avec des résidus de mannose, fucose ou encore GlcNAc à leurs extrémités. Les ligands naturels des CTLDs du MR sont des ligands microbiens comme les composants de la paroi de *Candida Albicans*, de *Streptococcus pneumoniae* ou de *Mycobacterium Tuberculosis* (Maródi *et al.*, 1991; Schlesinger *et al.*, 1996; Zamze *et al.*, 2002).

Le MR est principalement intracellulaire au niveau des endosomes, avec une faible proportion au niveau de la membrane plasmique. La présence d'IL-4, d'IL-13 et IL-10 favorise son expression transcriptionnelle, alors que l'IFN- γ l'inhibe. Le même cocktail de cytokines est retrouvé lors de la polarisation des macrophages, ce qui fait du MR un marqueur des macrophages de type M2. Ce faible taux de MR à la surface cellulaire est également régulé par un clivage protéolytique d'une métalloprotéinase qui rend le MR soluble (Martinez and Gordon, 2014; Rószler, 2015).

Le MR est impliqué dans des phénomènes de phagocytose, notamment de ligands mannosylés. A travers le transport endocytaire, la variation de pH libère le ligand du MR permettant son recyclage, mais également la prise en charge du ligand mannosylé par le CMH II au niveau des lysosomes (Sallusto *et al.*, 1995; Tan *et al.*, 1997).

C – Le récepteur DC-SIGN

Le DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin) ou CD209 est une protéine transmembranaire de type 1, faisant également partie des lectines de type C. Initialement, son expression était connue pour être exclusive aux cellules dendritiques, mais il est maintenant établi que le DC-SIGN peut être également exprimé au niveau des endothéliums et des macrophages, et plus particulièrement des macrophages M2 (Domínguez-Soto *et al.*, 2011; T. B. H. Geijtenbeek *et al.*, 2000; Lai *et al.*, 2006; Tailleux *et al.*, 2005). L'IL-13, cytokine sécrétée par les macrophages M2a, est responsable de l'expression du DC-SIGN (Soilleux *et al.*, 2002)

Il est composé d'une extrémité C-terminale extracellulaire avec un domaine CRD (Cystein Rich Domain) et un domaine Neck. L'extrémité N-terminale est intracellulaire et est composée de motifs d'internalisation comme les deux motifs di-leucine (LL), tri-acidique (EEE) et un domaine incomplet du motif d'activation des tyrosines des immuno-récepteurs (ITAM) (Figure 22).

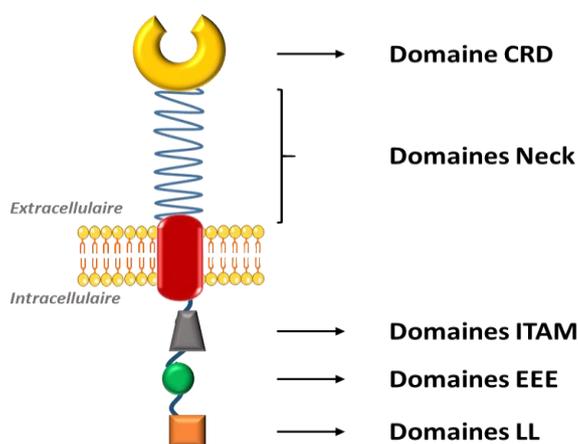


Figure 22 - Représentation schématique de la structure du DC-SIGN

Le DC-SIGN a besoin de former un homo-tétramère pour être fonctionnel. La formation du tétramère se fait au niveau des différents domaines Neck. A l'origine, le DC-SIGN fut identifié comme le récepteur d'ICAM-3 (Intercellular adhesion molecule-3) à la surface des lymphocytes T, mais également comme cible de la protéine virale GP120 du VIH (virus de l'immunodéficience humaine), facilitant ainsi l'infection des lymphocytes par le virus (T. B. Geijtenbeek *et al.*, 2000; T. B. H. Geijtenbeek *et al.*, 2000).

En réalité, le DC-SIGN reconnaît spécifiquement les motifs mannosylés, mais également les motifs fucosylés, comme les épitopes de type Lewis A et Lewis X mais aussi leurs dérivés difucosylés, les épitopes Lewis B et Lewis Y. L'interaction du DC-SIGN avec les motifs de type Lewis est préférentielle lorsque ces motifs sont sialylés ou sulfatés. Il peut également lier les motifs Lewis mono-fucosylés ou encore les *N*-glycannes de type oligomannosidique, mais avec une plus faible affinité (García-Vallejo *et al.*, 2008; Guo *et al.*, 2004; van Liempt *et al.*, 2006).

Depuis, il a été reporté que le DC-SIGN est le récepteur d'un grand nombre de pathogènes tels que *M. tuberculosis*, *C. albicans*, *Helicobacter pylori* et *Schistosoma mansoni*. Le DC-SIGN reconnaît les structures mannosylées, internes ou terminales, de ces pathogènes (Appelmek *et al.*, 2003; Cambi *et al.*, 2008; Tailleux *et al.*, 2005; van Die *et al.*, 2003).

En corrélation avec les interactions qu'il peut avoir avec des pathogènes et de par la présence des motifs d'internalisation au niveau de son extrémité cytoplasmique, le DC-SIGN est souvent décrit comme un récepteur phagocytaire. De plus, des expériences de colocalisation ont montré que, lors de l'exposition à un pathogène, le DC-SIGN se trouve au niveau du phagosome (Cambi *et al.*, 2008).

Il a été montré que la fixation de ligands au DC-SIGN induisait l'activation de la GTPase Ras. Une fois la protéine Ras activée, la voie de signalisation MAPK est activée et induit la phosphorylation de Raf-1. Raf-1 est une kinase dont le rôle est de phosphoryler la sous-unité p65 du facteur de transcription NF- κ B au niveau de la Sérine 276. Deux histones acétyltransférases, CREB (C-AMP Response Element-Binding protein) et p300, acétylent p65 et permettent l'activation de NF- κ B et la production d'IL-10 (Dunnen *et al.*, 2009; Gringhuis *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2013).

D – Les récepteurs NLRs

Les NLRs (NOD-like receptors) sont des récepteurs cytoplasmiques qui reconnaissent des produits bactériens mais également des DAMPs. Ces récepteurs partagent une organisation commune des différents domaines, avec un domaine N-terminal impliqué dans les interactions protéines/protéines, un domaine central NACHT et une extrémité C-terminale composée de motifs LRR impliqués dans la fixation de ligands (Motta *et al.*, 2015). Le domaine

NACHT est composé de sept motifs conservés distincts, dont une boucle à activité ATP/GTPase, un site de liaison au Mg^{2+} et cinq motifs plus spécifiques.

Il y a quatre extrémités N-terminale distinctes, ce qui permet de classer les NLRs en quatre familles : NLRA ; NLRB ; NLRC et NLRP. La famille NLRA ne contient qu'un seul membre, la protéine CIITA (MHC-II transactivator), pareillement pour la famille NLRB avec la protéine NAIP (neuronal apoptosis inhibitory protein). La famille NLRC se compose de six membres : NLRC1 (NOD1), NLRC2 (NOD2), NLRC3, NLRC4, NLRC5 et NLRX1. La sous-famille NLRP se compose de 14 membres, NLRP1-14 (Kim *et al.*, 2016).

Deux membres de ce groupe, NOD1 et NOD2 sont essentiels dans la réponse immunitaire innée à certaines infections bactériennes. NOD1 et NOD2 sont des protéines cytosoliques qui fixent des fragments de peptidoglycane bactérien et qui induisent les voies d'activation MAPK et NF- κ B. NOD1 détecte DAP (diaminopimelic acid), un dipeptide présent au niveau du peptidoglycane des bactéries à Gram négatif, mais aussi dans certains groupes de bactéries à Gram positif. En revanche, NOD2 détecte le MDP (muramyl dipeptide) qui est présent dans l'ensemble des peptidoglycanes bactériens (Laroui *et al.*, 2011; Mo *et al.*, 2012). La liaison des fragments de peptidoglycane se fait au niveau des motifs LRR de l'extrémité N-terminale. Cette fixation de ligands induit un changement conformationnel du récepteur qui permet ensuite l'oligomérisation du domaine NACHT. Le domaine C-terminal de NOD1 contient un domaine CARD (caspase activation and recruitment domains), alors que NOD2 en possède deux successifs. L'oligomérisation du domaine NACHT va permettre à la kinase RIP2 (receptor-interacting protein) de fixer NOD1 ou NOD2 par une interaction CARD/CARD (Magalhaes *et al.*, 2011). RIP2 permet le recrutement de la kinase TAK1 qui phosphoryle et active la kinase IKK. L'activation de IKK entraîne la phosphorylation de l'inhibiteur I κ B, ce qui libère NF- κ B et permet sa translocation vers le noyau.

L'ensemble de ces récepteurs participent à la mise en place de la réponse immunitaire lors d'une infection ou d'une inflammation. Cependant, ils ont également besoin d'être régulés afin d'éviter une activation constante des voies de signalisation qui en découlent. Les protéines membranaires des cellules immunitaires étant majoritairement glycosylées, nous allons ensuite voir comment les glycanes peuvent participer à la régulation de la réponse immunitaire.

Chapitre 3 : La Glycosylation : Régulateur des processus immunitaires

Les variations de la glycosylation membranaire et leurs fonctions biologiques ont été particulièrement étudiées dans les processus de cancérisation, d'auto-immunité et d'inflammation. Ces réarrangements structuraux affectent la sialylation, la sulfatation, la fucosylation ou encore l'antennarisation des glycanes et sont perçus par de nombreuses lectines du système immunitaire. En retour, ces lectines modulent diverses fonctions cellulaires telles que la migration et l'adhésion des cellules, les voies de signalisation intracellulaire ou encore l'apoptose (Rabinovich *et al.*, 2012; Wolfert and Boons, 2013). A l'échelle moléculaire, la plupart des récepteurs de l'immunité sont des glycoprotéines. Les variations structurales des glycanes peuvent moduler la conformation des protéines et influencer leur localisation cellulaire, leur fonction et leur activation.

I – Recrutement cellulaire

L'endothélium vasculaire permet le recrutement des leucocytes vers les tissus enflammés. Pour que les leucocytes circulants pénètrent dans un tissu inflammatoire, ils doivent adhérer aux cellules endothéliales bordant les parois des vaisseaux sanguins puis passer à travers ces cellules endothéliales. Il s'agit du phénomène d'extravasation. Le processus d'extravasation peut être divisé en quatre étapes : roulement, activation, arrêt/adhésion et migration trans-endothéliale (Ley *et al.*, 2007).

Lors de l'étape de roulement, les leucocytes établissent un contact intime avec l'endothélium vasculaire grâce aux chimiokines liées à l'endothélium capables d'interagir avec leurs récepteurs respectifs présents à la surface des leucocytes. Des voies de signalisation sont induites et déclenchent l'activation des intégrines et des sélectines (Figure 23).

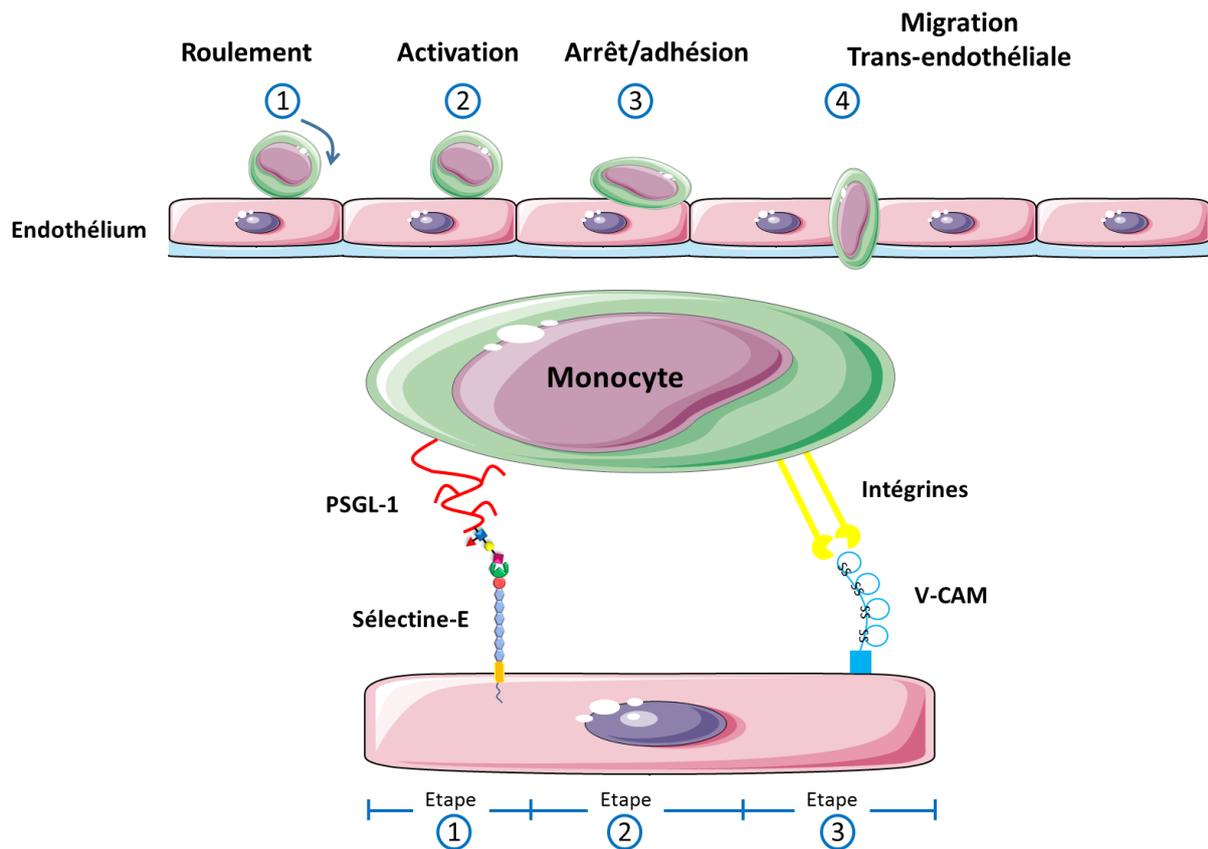


Figure 23 – Recrutement des monocytes au niveau de l'endothélium

Les différentes étapes du recrutement des monocytes font intervenir des glycoprotéines. Le roulement initial est médié par la liaison des sélectines de l'endothélium avec les motifs Sialyl Lewis X des glycoprotéines de la membrane monocyttaire. Lors de l'étape d'adhésion, les intégrines entrent en interaction avec les molécules d'adhésion et ainsi permettent une adhésion renforcée avec l'endothélium.

A – Interaction Sélectines / Glycannes

1 – Présentation

Les sélectines sont des protéines transmembranaires de type 1 et font partie des lectines de type C. Les mammifères expriment trois types de sélectines : les P-sélectines, les E-sélectines et les L-sélectines. Les P-sélectines sont exprimées au niveau des cellules endothéliales et des plaquettes (Gotsch *et al.*, 1994; Lorenzon *et al.*, 1998). Les E-sélectines, contrairement aux P-sélectines, sont exprimées uniquement au niveau des cellules endothéliales. Pour finir, les L-sélectines sont exprimées à la surface des leucocytes circulants (Tableau 3) (Ivetic and Ridley, 2004). Elles possèdent toutes un domaine CRD à l'extrémité C-terminale, suivi d'un domaine

EGF (epidermal growth factor) puis d'un nombre variable d'unités de répétitions (2, 6, et 9 respectivement pour les L-, E-, et P-sélectines) (Figure 24) (Ley, 2003).

Sélectines	Distribution
E-sélectines	Endothéliums activés
P-sélectines	Endothéliums activés ; plaquettes activées
L-sélectines	Monocytes ; neutrophiles ; Lymphocytes T et B

Tableau 3 -Distribution des différentes sélectines

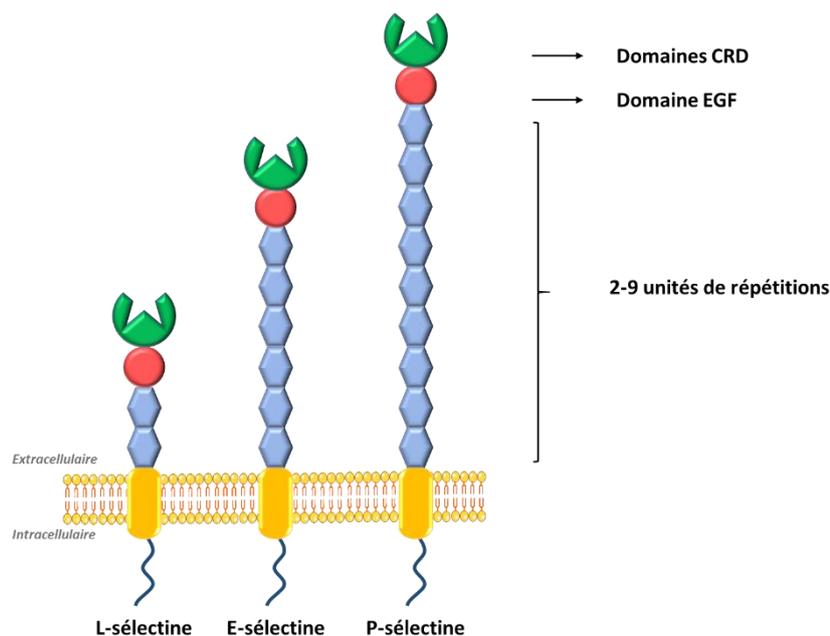


Figure 24 - Représentation schématique de la structure des L-, E- et P-sélectines

Les sélectines sont connues pour avoir comme ligands préférentiels le Sialyl Lewis X ou le Sialyl Lewis A ou encore d'autres ligands chargés (Lowe *et al.*, 1990; Varki, 1994; Vestweber, 1993). Les P- et E-sélectines ont pour ligand PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1), une glycoprotéine de type mucin-like exprimée à la surface des leucocytes. L'étude de la structure de cette glycoprotéine a montré que PSGL-1 contenait des sites de O-glycosylation présentant des motifs Sialyl Lewis X (Asa *et al.*, 1995; Wilkins *et al.*, 1996). Cet épitope peut être également sulfaté au niveau de la position 6 de la GlcNAc (Ohmori *et al.*, 2000).

Dans le cas des L-sélectines, elles interagissent avec la glycoprotéine GlyCAM-1 (glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1), liée à l'endothélium des ganglions lymphatiques. Comme PSGL-1, GlyCAM-1 porte des chaînes de O-glycannes qui arborent des motifs Sialyl Lewis X, mais également des motifs 6'-sulfo-Sialyl Lewis X (Hemmerich and Rosen, 1994). Des travaux de l'équipe de Mitsuoka ont déterminé que les L-sélectines ont une affinité plus importante pour les ligands sulfatés (Kawashima, 2006; Mitsuoka *et al.*, 1998, 1997).

2 – Rôle des fucosyltransférases

Le résidu de fucose, lié en $\alpha 1,3$ du GlcNAc du motif Lewis X, est l'élément essentiel dans l'interaction entre les sélectines et les molécules d'adhésion. Les fucosyltransférases *FUT4* et *FUT7*, deux $\alpha 1,3$ -fucosyltransférases connues pour synthétiser du Lewis X, sont exprimées au niveau des leucocytes (Clarke and Watkins, 1996; Huang *et al.*, 2000).

Maly *et al.* ont montré, dans des souris déficientes en *FUT4* et *FUT7*, une diminution notable de l'adhérence des leucocytes au niveau des cellules endothéliales des ganglions lymphatiques (Malý *et al.*, 1996). De nombreuses études montrent l'implication des $\alpha 1,3$ -fucosyltransférases dans les processus inflammatoires (Homeister *et al.*, 2001). Il a notamment été observé que l'exposition au TNF α des cellules épithéliales bronchiques induit une surexpression des *FUT3* et *FUT4* (Delmotte *et al.*, 2002). Dans le même sens, ces cellules surexpriment les enzymes *FUT3* et *FUT11* lorsqu'elles sont exposées à de l'IL-6 et à de l'IL-8 comme dans les cas de fibroses cystiques. En plus de cela, les sulfotransférases CHST2 et CHST6 (carbohydate sulfotransférase), impliquées dans la synthèse du 6-sulfo-sialyl Lewis X, sont surexprimées dans ce contexte inflammatoire (Groux-Degroote *et al.*, 2008b).

Ces fucosyltransférases jouent également un rôle dans la progression des cancers, notamment lors de cancer de la prostate où les enzymes *FUT3*, *FUT6* et *FUT7* sont surexprimées au niveau des cellules métastatiques et favorisent les interactions avec les E-sélectines (Barthel *et al.*, 2009).

3 – Rôle des Sialyltransférases

En plus des fucosyltransférases, l'adhésion cellulaire peut être régulée par l'expression des sialyltransférases, et plus précisément des $\alpha 2,3$ -sialyltransférases qui participent à la synthèse

du Sialyl Lewis X. Il en existe 3 : ST3Gal-III, ST3Gal-IV et ST3Gal-VI (Mondal *et al.*, 2015; Sperandio, 2012).

Chez des souris déficientes en ST3Gal-IV, il y a une diminution significative de l'adhésion des neutrophiles au niveau des P- et E-sélectines (Ellies *et al.*, 2002). Des études récentes ont également prouvé qu'avec ces mêmes souris déficientes en ST3Gal-IV, il y avait non seulement une diminution de l'adhérence des neutrophiles et des monocytes après stimulation par RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted), cytokine qui induit l'expression de ICAM-1 et VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1), mais que cette perte d'adhésion des leucocytes induit une diminution de l'inflammation dans les cas d'athérosclérose et de l'apoptose des cellules de la plaque athérosclérotique (Döring *et al.*, 2014).

Dans les cas de myélome multiple des os, les cellules myéloïdes surexpriment la ST3Gal-VI contrairement aux individus sains. Il est montré qu'un haut niveau d'expression de cette enzyme est en corrélation avec une faible survie des patients. Par contre, lorsque le gène de cette enzyme est éteint, il y a une diminution de l'adhésion des cellules myéloïdes aux cellules endothéliales (Glavey *et al.*, 2014).

B – Les Intégrines dans le recrutement cellulaire

Comme les sélectines, les intégrines sont des molécules d'adhérence cellulaire. Ce sont des glycoprotéines transmembranaires de type 1, constituées d'un hétérodimère entre une sous-unité α et une sous-unité β . Chez les mammifères, 18 sous-unités α et 8 sous-unités β , capables de former 24 dimères d'intégrines, ont été identifiées. L'association $\alpha\beta$ détermine la spécificité de l'intégrine pour son substrat (Desgrosellier and Cheresch, 2010).

Contrairement aux sélectines, les intégrines ne lient pas des ligands glycosylés. En général, les intégrines reconnaissent des séquences peptidiques courtes, la plus répandue étant Arg-Gly-Asp, retrouvée sur de nombreuses protéines de la matrice extracellulaire telles que la fibronectine et les collagènes. Cette reconnaissance du ligand s'effectue au niveau de la sous-unité α des intégrines, et plus particulièrement sur un motif hélice β .

Les intégrines sont des glycoprotéines, notamment des protéines *N*-glycosylées. Isaji *et al.* ont montré que les sites de *N*-glycosylation de l'hélice β de la sous-unité α sont essentiels à

l'hétérodimérisation du couple d'intégrines $\alpha 5\beta 1$. De plus, ils ont montré que l'ajout de certains résidus, notamment d'un résidu de GlcNAc en $\beta 1,3$ par la MGAT3 sur le premier résidu de mannose du core glycanique, provoque une perte importante de l'adhésion cellulaire (Hang *et al.*, 2017; Isaji *et al.*, 2009, 2006, 2004).

Comme pour les sélectines, les sialyltransférases ont également un impact sur le contrôle des interactions des leucocytes. Des monocytes CD14⁺ issus de cultures primaires et de la lignée cellulaire U937 différenciée en macrophages montrent une perte de la sialylation en $\alpha 2,6$ des *N*-glycannes portés par la sous unité β du couple d'intégrines $\alpha 4\beta 1$, ainsi qu'une augmentation de l'adhésion cellulaire à la molécule d'adhésion VCAM-1. La surexpression de ST6Gal1, l' $\alpha 2,6$ sialyltransférase la plus importante, montre une perte de l'adhésion à VCAM-1 (Semel, 2002; Woodard-Grice *et al.*, 2008).

Les processus d'adhésion et d'invasion cellulaires sont des mécanismes très importants dans des pathologies comme les cancers, surtout dans le développement des métastases. Certaines enzymes de la glycosylation sont connues pour être surexprimées dans certains types de cancers virulents. Notamment, la MGAT5, une $\beta 1-6$ -*N*-acétylglucosaminyltransférase impliquée dans la formation des *N*-glycannes tétra-antennés, favorise l'interaction entre la fibronectine et les intégrines $\alpha 3\beta 1$ et $\alpha 5\beta 1$ dans les métastases de mélanomes (Kariya *et al.*, 2017; Pocheć *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2008). A l'inverse, des monocytes humains exposés à l'INF- γ montrent une forte diminution de l'activité de la MGAT5 et une augmentation de l'adhésion à l'endothélium vasculaire du couple $\alpha 5\beta 1$ (Yang *et al.*, 2012).

II – Différenciation et maturation cellulaire

A – Différenciation monocyte/macrophage

Les macrophages ainsi que leurs précurseurs, les monocytes, régulent l'immunité innée, notamment dans l'initiation et la régulation de la réponse inflammatoire, et participent dans la mise en place de l'immunité adaptative via le traitement et la présentation des antigènes. La différenciation des monocytes en macrophages conduit à un changement phénotypique caractérisé par l'expression de marqueurs de surface (molécules co-activatrices/molécules d'adhésion) et la production de médiateurs de l'inflammation, pro- ou anti-inflammatoires. Différentes études ont montré des variations d'expression de glycosyltransférases et de

glycosidases lors de la maturation des monocytes en macrophages (Kohro *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 1998; Trottein *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2003).

A la fin des années 80, des équipes différentes ont montré lors de la différenciation en macrophages des lignées monocytaires HL-60 et U937 par le TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate) une surexpression de la ST3Gal-V, enzyme clé pour l'entrée dans la voie de biosynthèse des gangliosides (Momoi *et al.*, 1986; Nojiri *et al.*, 1986). La ST3Gal-V permet la synthèse du GM3 [NeuAc(α 2,3)Gal(β 1,4)Glc(β 1)Cer], le ganglioside le plus simple. La surexpression de la ST3Gal-V est un mécanisme dépendant de la voie PKC/ERK/CREB, activée par les agents de différenciation comme les esters de phorbols tel que le PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate) (Choi *et al.*, 2007). Gracheva *et al.* ont également reporté une surexpression de la ST3Gal-V au niveau des macrophages issus de cultures primaires de sang humain, mais également une augmentation des niveaux de GM3 (Gracheva *et al.*, 2009, 2007). Il a été montré que le GM3 joue un rôle dans l'adhésion cellulaire, et notamment en favorisant l'interaction du couple d'intégrines α 5 β 1 à la fibronectine (Zheng *et al.*, 1993).

Lors de la différenciation, les marqueurs de surface disparaissent et apparaissent, et parmi ces marqueurs, on retrouve notamment les motifs Lewis X (CD15) et Sialyl Lewis X (sCD15). Les monocytes expriment à leur surface le Sialyl Lewis X, nécessaire à leur recrutement au niveau des foyers inflammatoires avant leur différenciation. Après différenciation, les cellules HL-60 différenciées par le TPA ou par le DMSO (diméthylsulfoxyde) n'expriment plus le Sialyl Lewis X mais du Lewis X (Klein *et al.*, 1998; Skacel *et al.*, 1991). Par contre, il a été montré sur des monocytes isolés de sang humain que la différenciation par le GM-CSF augmentait l'expression de Sialyl-Lewis X à la surface cellulaire (Trottein *et al.*, 2009), alors que des monocytes différenciés par la concanavaline A présentaient moins de Sialyl Lewis X (Prieto *et al.*, 1994).

Stamatos *et al.* ont prouvé qu'il y avait une surexpression des neuraminidases *NEU1* et *NEU3* suite à la différenciation. Ils ont également montré que la différenciation des macrophages induit la sécrétion de *NEU1* du lysosome vers la membrane plasmique, aussi bien chez les cellules THP-1 différenciées que sur les macrophages obtenus à partir de monocytes de sang humain (Liang *et al.*, 2006; Stamatos *et al.*, 2005). La balance entre le Sialyl Lewis X et le Lewis X à la membrane est un mécanisme directement lié à l'activité des neuraminidases (Gadhoun and Sackstein, 2008). Très récemment, des travaux ont montré que la différenciation des

macrophages augmentait la sialylation des cellules par rapport aux monocytes. Ceci s'explique par la surexpression de différentes sialyltransférases (ST6GAL1 ; ST3GAL5 ; ST3GAL1). En plus de la différenciation, la polarisation des macrophages induit également des niveaux différents de sialylation. Les lysats cellulaires des macrophages M1 montrent des taux de sialylation moins importants que ceux des macrophages M2, aussi bien la sialylation en $\alpha 2,3$ qu'en $\alpha 2,6$. (Wang *et al.*, 2016).

B – Différenciation et maturation des cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (DCs) sont des cellules présentatrices professionnelles capables de présenter des antigènes aux lymphocytes, et réguler l'immunité cellulaire et humorale. Plusieurs classes de DCs existent, et notamment des DCs dérivées de monocytes du sang.

Julien *et al.* ont montré que l'expression de Sialyl Lewis X, était principalement dépendante de l'expression de PSGL-1. En effet, PSGL-1 est la seule glycoprotéine des monocytes et des DCs immatures qui arbore des motifs Sialyl Lewis X. Cependant, lors de la maturation des DCs humaines par le LPS, PSGL-1 est toujours exprimée au niveau des DCs matures, mais la glycoprotéine ne présente plus ces motifs (Julien *et al.*, 2007; Trottein *et al.*, 2009).

Les premiers travaux sur les variations de glycosylation lors de la maturation des DCs ont montré une surexpression de la ST3Gal-VI et une baisse d'expression des ARNm codant la ST6Gal-I. Des expériences de fixations de lectines végétales fluorescentes concluent finalement qu'il y a une perte de la sialylation en $\alpha 2,6$ lors de la maturation des DCs avec des cytokines pro-inflammatoires, et aucune variation de la sialylation en $\alpha 2,3$. De plus, à l'aide de substrats fluorescents, il a été montré que les DCs matures ont une plus grande capacité à lier des ligands sialylés en $\alpha 2,6$ (Jenner *et al.*, 2006).

Les travaux de Julien *et al.* ont confirmé cette surexpression de ST3Gal-I mais ils ont également montré une perte de l'expression de C2GnT1 et C2GnT2, deux enzymes impliquées dans la synthèse du noyau des O-glycannes de type 2. Ils confirment par spectrométrie de masse que les motifs Sialyl Lewis X des monocytes et des DCs immatures sont portés par des O-glycannes de type 2. Lors de la même année, des travaux similaires ont corroboré cette perte d'expression des C2GnTs, mais ont aussi montré que lors de la maturation des DCs par le LPS, il y avait une perte de la fucosylation des N-glycannes. Cette perte de fucosylation au niveau

des *N*-glycannes peut également conduire à une perte du motif Sialyl Lewis X au niveau des antennes des *N*-glycannes (Bax *et al.*, 2007).

Contrairement à l'étude de Jenner, la maturation des DCs par le LPS et non par des cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL-1 β) induit des différences de fixation de lectines avec, cette fois-ci, une augmentation de la sialylation en α 2,6, et une légère augmentation de la sialylation en α 2,3.

Ces changements de glycosylation vont jouer un rôle important dans la biologie des DCs, plus particulièrement dans les interactions qu'elles peuvent avoir avec des récepteurs lectiniques comme les galectines et les SIGLECs (sialic acid binding Ig-like lectins). Bax *et al.* rapportent que la maturation des DCs augmente leur affinité pour les SIGLEC-1, SIGLEC-2 et SIGLEC-7 et pour les galectines -3 et -8. Les SIGLEC-1 (ou sialoadhésine) fixent avec une plus grande affinité les glycannes sialylés en α 2,3, à l'opposé des SIGLEC-2 qui lient l'acide sialique en α 2,6 et des SIGLEC-7 qui fixent les motifs polysialylés (NeuA α 2,8NeuA α 2,3Gal). La SIGLEC-1 joue un rôle dans la régulation des lymphocytes. Son activation va inhiber la différenciation des cellules T naïves en lymphocytes T CD8⁺.

Après maturation avec un stimulus bactérien comme le LPS, une augmentation générale de la sialylation totale est observée à la surface des DCs murines matures par rapport aux monocytes. Comme pour les macrophages, la différenciation des monocytes en DCs induit l'expression de deux neuraminidases, *NEU1* et *NEU3*. De plus, cette différenciation permet la translocation de *NEU1* à la membrane (Stamatos *et al.*, 2010).

Cette sialylation affecte la capacité des monocytes et des DCs à endocyter des molécules, comme l'ovalbumine fluorescente. Suite à un traitement avec une neuraminidase, enzyme qui clive les acides sialiques, le nombre de molécules incorporées diminue au niveau des DCs, contrairement aux monocytes où il augmente (Videira *et al.*, 2008).

III – Régulation de la phagocytose par la glycosylation

Les DCs et les macrophages utilisent différentes voies pour capturer des antigènes, notamment la macropinocytose, l'endocytose et la phagocytose. La macropinocytose est un mécanisme absent chez les monocytes. Videira *et al.* ont émis l'hypothèse que la désialylation des DCs induit une diminution de la macropinocytose (Videira *et al.*, 2008). Récemment, des

travaux ont montré que la mutation du résidu Asn80 du DC-SIGN conduisait à une diminution de l'interaction avec les molécules de clathrine. Cela prouve que le *N*-glycane porté par ce résidu permet une endocytose plus efficace du DC-SIGN (Torreno-Pina *et al.*, 2014).

Comme décrit précédemment, la différenciation des monocytes en macrophages ou en cellules dendritiques conduit à une surexpression des neuraminidases *NEU1* et *NEU3*, avec une migration de *NEU1*, connue pour être une enzyme lysosomale, vers la membrane plasmique. Nous avons vu également qu'une activité neuraminidase exogène régula le pouvoir endocyttaire des cellules dendritiques. Il y aurait donc vraisemblablement un lien entre la sialylation membranaire des cellules présentatrices d'antigènes et la phagocytose.

Il a été montré chez des souris déficientes du gène *NEU1* et à l'aide de billes fluorescentes, une faible activité de phagocytose au niveau des macrophages. Cependant, l'ajout d'une neuraminidase exogène restaure l'activité de phagocytose des macrophages (Seyrantepe *et al.*, 2010).

Plus récemment, il a été décrit que l'activité sialidase favorisait la phagocytose de bactéries comme *Escherichia coli*, au niveau des DCs immatures et matures. De plus, cette étude a montré que la désialylation des membranes des DCs n'affecte pas l'intégrité du cytosquelette et l'activité de Rac1 et Cdc42 (cell division cycle), deux GTPases impliquées dans le réarrangement des filaments d'actine lors de la phagocytose. Néanmoins, après exposition à *E. coli* et traitement par une sialidase, Cdc42 n'est plus active. De plus, l'ajout du CMP-Neu5Ac (cytidine-5'-monophospho-N-acétylneuraminic acid), substrat des sialyltransférases, dans le milieu diminue l'activité phagocytaire des DCs même en présence de sialidases. Cela prouve la présence d'une activité sialyltransférase au niveau de la membrane plasmique des DCs permettant de réguler les récepteurs impliqués dans la phagocytose (Cabral *et al.*, 2013, 2010).

Parmi les récepteurs à activité phagocytaire, on retrouve le récepteur à mannose. Ce récepteur porte sept sites potentiels de *N*-glycosylation. Dans des cellules rénales de hamster CHO-LEC2, qui ne présentent pas le transporteur du CMP-Neu5Ac, l'activité lectinique du récepteur est perdue. Les glycanes portés par le récepteur ne sont plus sialylés, et le mannose récepteur ne fixe plus de ligands mannosylés (Su *et al.*, 2005). Cette perte de la

sialylation peut jouer un rôle important dans la phagocytose de microorganismes qui présentent des polysaccharides mannosylés au niveau de leur paroi.

IV – Présentation d’antigènes

Les cellules présentatrices d’antigènes comme les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules B ont la capacité de capturer des antigènes, de les dégrader et de les apprêter. Les antigènes endogènes, cellulaires ou issus de pathogènes intracellulaires sont présentés aux lymphocytes T CD8⁺ par l’intermédiaire du complexe majeur d’histocompatibilité de classe I (CMH I). Quant aux antigènes exogènes, ils sont présentés aux lymphocytes T CD4⁺ via le CMH de classe II. Le CMH de classe I est ubiquitaire, il est présent dans l’ensemble des cellules de l’organisme, contrairement aux CMH de classe II spécifique des CPAs.

A – Complexe majeur d’histocompatibilité de classe I

Les molécules du CMH de classe I forment un hétérodimère composé d’une chaîne lourde transmembranaire et de la β 2-microglobuline, seule protéine du système immunitaire non-glycosylée. La chaîne lourde du CMH I possède un seul site de *N*-glycosylation conservé au niveau de l’asparagine 86. Les CMH I sont un très bon exemple pour comprendre le rôle de la *N*-glycosylation dans la mise en conformation de protéines et dans le trafic intracellulaire vers la membrane. Il a été montré que la perte de la glycosylation au niveau de l’Asn86 réduisait de façon drastique l’export de CMH I à la membrane (Barbosa *et al.*, 1987).

B – Complexe majeur d’histocompatibilité de classe II

Les molécules du CMH de classe II forment également un hétérodimère entre une chaîne α et une chaîne β , dont chacune possède un domaine transmembranaire, contrairement au CMH I qui n’est composé que d’une seule chaîne lourde. Le CMH de classe II possède trois sites de *N*-glycosylation conservés, deux sur la chaîne α (Asn78 et Asn118) et un sur la chaîne β (Asn19). Contrairement au CMH I, ces sites de *N*-glycosylation ne sont pas indispensables pour la bonne mise en conformation du complexe et sa migration vers la membrane plasmique. Lors de la synthèse du CMH II dans le RE, le complexe est lié à une chaîne invariante qui stabilise sa structure avant la liaison de l’antigène sur le CMH (Ryan and Cobb, 2012).

Une des premières études sur la glycosylation du CMH II a montré l'impact de la glycosylation sur la présentation de l'antigène au niveau des cellules B. Un traitement à la neuraminidase libérant les acides sialiques portés par les molécules du CMH II augmente de manière considérable la présentation d'antigènes des cellules B (Frohman and Cowing, 1985). Par contre, si les résidus α Asn78 et β Asn19 sont mutés et donc dépourvus de *N*-glycannes, la spécificité de la réponse des lymphocytes T est influencée (Wei *et al.*, 1991).

Plus récemment, Ryan *et al.* ont montré que les cellules B qui arborent des glycannes de type oligomannosidique ont une capacité de présentation d'antigène diminuée. Dans cette étude, des cellules B déficientes en MGAT2, enzyme qui permet l'obtention des *N*-glycannes de type complexe, perdent la capacité de présentation d'antigènes glycosylés comme le polysaccharide A de *Bacteroides fragilis*, mais pas la présentation des antigènes peptidiques conventionnels (Ryan *et al.*, 2011).

C – Glycosylation des récepteurs des cellules T

Le récepteur des cellules T (TCR) est composé de sept protéines transmembranaires impliquées dans la reconnaissance des antigènes présentés par les protéines du CMH présents à la surface des CPAs. La reconnaissance des antigènes est régulée par les chaînes α/β , tandis que les chaînes du CD3 (γ , δ , ϵ et ζ) sont responsables de la transduction du signal de reconnaissance vers le cytoplasme, ce qui conduit à l'activation des cellules et à la réponse adaptative (Call *et al.*, 2002; Wucherpfennig *et al.*, 2010).

Des premiers travaux ont montré au début des années 2000 que des lymphocytes T de souris déficientes en MGAT5 présentaient une hypersensibilité après stimulation du TCR (Demetriou *et al.*, 2001). Cette même étude explique que les *N*-glycannes portés par le TCR sont modifiés par la MGAT5, permettant la fixation de la galectine-3 extracellulaire qui reconnaît les motifs β -galactosides. De plus, il a été montré chez ces mêmes souris que les cellules déficientes en MGAT5 produisaient plus de cytokines de type Th1 (TNF α : INF- γ) alors que les cellules sauvages produisent plus de cytokines de type Th2 (IL-4) (Morgan *et al.*, 2004). Dans le même sens, des cellules T de souris mutantes avec des chaînes α et β dépourvues de site de glycosylation ont une activité plus importante. La perte de la *N*-glycosylation améliore la formation du complexe TCR et diminue la dissociation entre le TCR et le CMH pour une activation plus efficace des cellules T (Kuball *et al.*, 2009).

Dans certaines maladies inflammatoires chroniques de l'intestin comme la maladie de Crohn, il a été prouvé que les cellules T n'exprimaient plus la MAGT5, ce qui a pour conséquence de produire des *N*-glycannes incapables de réguler l'activité du TCR, et d'induire ainsi une surproduction de cytokines pro-inflammatoires (Dias *et al.*, 2014). Normalement, suite à l'activation du TCR, les enzymes impliquées dans la biosynthèse de *N*-glycannes complexes sont surexprimées. Il ne s'agit pas uniquement de MGAT5, mais également des mannosidases MANA1 et MANA2, enzymes responsables de l'entrée des *N*-glycannes dans la voie de maturation (Chen *et al.*, 2009).

V – Régulation de l'apoptose

L'apoptose joue un rôle déterminant au cours de processus physiologiques aussi différents que le développement et le contrôle du renouvellement cellulaire et tissulaire. La régulation de l'apoptose est également fondamentale pour l'homéostasie du système hématopoïétique et du système immunitaire car elle permet de contrôler étroitement la croissance des sous populations cellulaires.

De nombreux signaux très différents, physiologiques ou pathologiques, intra comme extracellulaires ont été identifiés comme pouvant déclencher l'apoptose. Ainsi, elle peut être induite par la carence en facteurs de croissance (NGF (nerve growth factor), IL-2...), par la liaison de certains récepteurs membranaires (Fas, p75NTR...) à leurs ligands, ou par des lésions cellulaires (radiations ionisantes, agents cytotoxiques, chocs osmotiques, hyperthermie). Ces signaux doivent alors être intégrés par la cellule qui, en fonction de son degré de différenciation et d'activation, va orienter sa réponse vers la mort, vers la survie, la prolifération ou la différenciation. Cette intégration fait appel à un certain nombre de médiateurs intracellulaires qui sont soit anti- soit pro-apoptotiques selon le type cellulaire et les molécules présentes dans l'environnement (Guicciardi and Gores, 2009).

Parmi les molécules effectrices de l'apoptose, il existe des récepteurs dits récepteurs de mort qui appartiennent à la superfamille des TNF-R. Les membres de la famille du TNF-R sont des protéines transmembranaires de type 1 possédant, dans leur domaine extracellulaire, de deux à six régions CRD, avec 9 résidus de cystéine impliqués dans la liaison du ligand. Ils peuvent promouvoir, selon le contexte cellulaire, la survie ou la mort (Guicciardi and Gores, 2009).

Certains des membres de la superfamille des récepteurs au TNF possèdent, dans leur portion intracellulaire, une région conservée appelée domaine de mort (DD) et sont connus sous le nom de récepteurs de mort. Le DD est un motif protéique d'environ 80 acides aminés nécessaire à la transmission du signal de mort par ces récepteurs (Locksley *et al.*, 2001).

A – Récepteurs TRAIL-R

Les récepteurs TRAIL-R (Tumor-necrosis-factor Related Apoptosis Inducing Ligand-Receptor) jouent un rôle important dans les fonctions physiologiques pendant les surveillances tumorales et virales. Leur induction induit la formation du complexe DISC (Death-Inducing Signaling Complex), formé de la caspase-8 et de la caspase-10, recrutées au niveau de la protéine adaptatrice FADD (Fas-Associated protein with Death Domain). La formation de DISC permet l'activation des caspase-3 et caspase-7 par clivage protéolytique au niveau du cytosol.

Après stimulation de TRAIL-R1 et TRAIL-R2 par le ligand Apo2L/TRAIL, une augmentation importante de l'expression d'enzymes impliquées dans la biosynthèse des *O*-glycannes a été relevée dans différents tissus cancéreux, et en particulier la GalNT14, une ppGalNAcT (Wagner *et al.*, 2007). Lors d'ajout d'inhibiteurs de la *O*-glycosylation ou lors de l'inhibition de la GalNT14, une nette diminution du nombre de cellules en apoptose est relevée après stimulation par Apo2L. Il a également été prouvé que la surexpression de GalNT14 induisait une augmentation de l'apoptose provoquant une diminution de la croissance tumorale. Cela a permis d'identifier également un site de *O*-glycosylation au niveau de la Ser201 de TRAIL-R2. Enfin, la *O*-Glycosylation des TRAIL-R facilite la réponse du récepteur suite à la fixation de ligand en permettant la formation du complexe DISC et l'activation de la caspase-8 (Wagner *et al.*, 2007).

Suite à un traitement à la tunicamycine, un inhibiteur de la *N*-glycosylation et un inducteur du stress réticulaire, il a été démontré que le récepteur TRAIL-R1 était glycosylé (Yoshida *et al.*, 2007). TRAIL-R1 est un récepteur qui possède un site de *N*-glycosylation au niveau de son résidu Asn156. Il a été montré que ce récepteur était glycosylé chez l'homme mais également son homologue murin mTRAIL-R (Dufour *et al.*, 2017).

La *N*-glycosylation de TRAIL-R1 n'est pas un élément indispensable à la fixation des ligands car le site de *N*-glycosylation n'est pas localisé dans un des domaines CRD. Par contre, il a été

montré que le récepteur *N*-déglycosylé avait une affinité 5 fois supérieure à celle du récepteur *N*-glycosylé vis-à-vis de la glycoprotéine UL141 du cytomégalovirus. La glycosylation du résidu Asn156 est cependant nécessaire à la formation du complexe DISC. De plus, la perte de la *N*-glycosylation de TRAIL-R1 va diminuer le nombre de cellules apoptotiques (Dufour *et al.*, 2017).

B – Le récepteur Fas/CD95

Le récepteur Fas est une glycoprotéine transmembranaire de 335 acides aminés divisée en 3 parties. L'extrémité N-terminale est extracellulaire et est composée de trois domaines CRDs. Les deux domaines les plus proches du segment transmembranaire permettent la fixation du ligand et donnent le LBD (Ligand binding domain). Le dernier domaine CRD, ou domaine PLAD (Pre Ligand association domain) va permettre l'oligomérisation du récepteur nécessaire à la transduction du signal. L'extrémité C-terminale intracellulaire composée du domaine DD permet, comme pour TRAIL-R, la fixation de protéines adaptatrices comme FADD, nécessaire à la formation du complexe DISC (Lambert *et al.*, 2003).

A partir des informations de séquences et des analyses de bioinformatique, deux sites de *N*-glycosylations ont été prédits : Asn118 et Asn136. Ces études *in silico* ont été corroborées par des expériences de mutagenèse dirigée couplées à l'hydrolyse des *N*-glycannes potentiels par la PNGase F confirmant la glycosylation de ces deux asparagines (Shatnyeva *et al.*, 2011). Une fois Fas déglycosylée, la caspase-8 est plus faiblement activée, car les *N*-glycannes portés par Fas participent à la formation du complexe DISC.

Des expériences de co-immunoprécipitation couplées à un marquage par la lectine SNA (*Sambucus Nigra Agglutinin*) spécifique de la sialylation en $\alpha 2,6$ montrent que le récepteur Fas porte des glycannes sialylés en $\alpha 2,6$, et que cette sialylation était le résultat de la ST6Gal1. Dans la même année, Swindall & Bellis ont utilisé des cellules sous-exprimant la ST6Gal-I et ont démontré qu'après incubation avec des ligands de Fas et TRAIL, l'activation de la caspase-3 était supérieure uniquement après l'exposition au ligand de Fas. En parallèle, ils ont observé que cette surexpression de ST6Gal1 couplée au signal apoptotique FasL induisait une apoptose plus faible (Swindall and Bellis, 2011).

Cette sialylation en $\alpha 2,6$ a donc un rôle protecteur vis-à-vis des cellules. Il est connu à ce jour que l'apoptose des cellules peut être régulée par des interactions lectiniques, notamment avec les galectines.

Les galectines sont des protéines reconnaissant les motifs β -galactosides des glycanes. Elles ne possèdent pas de domaine de transduction de signaux, mais leur fixation à des protéines peut induire des signaux diverses dont des signaux d'apoptose (Dam and Brewer, 2010). Il est connu que la galectine-1 a une activité pro-apoptotique au niveau des lymphocytes T. Plus particulièrement, au niveau du récepteur Fas, il est connu que la galectine-1 stimule l'activité apoptotique du récepteur (Matarrese *et al.*, 2005).

Il a déjà été établi que la sialylation en $\alpha 2,6$ pouvait avoir un rôle anti-apoptotique vis-à-vis des galectines (Zhuo *et al.*, 2008; Zhuo and Bellis, 2011). La diminution de l'apoptose induite via le récepteur Fas, lorsque celui-ci est sialylé, peut être la conséquence directe d'une perte d'interaction avec les galectines.

C – Le récepteur au TNF (TNFR)

Les récepteurs aux TNFR1 et TNFR2 sont les deux glycoprotéines transmembranaires, ainsi que les récepteurs principaux du TNF. Ils diffèrent de par leur structure et de par leur distribution : le TNFR1 est exprimé sur l'ensemble des cellules de mammifères alors que TNFR2 est exprimé au niveau des cellules immunitaires et endothéliales.

Le domaine extracellulaire comporte quatre domaines CRD qui vont permettre la fixation du TNF. Par contre, les parties intracellulaires des deux récepteurs diffèrent. Au niveau de TNFR1, l'extrémité cytoplasmique contient un domaine DD qui va permettre le recrutement de la protéine adaptatrice TRADD (TNFR-1 Associated Death Domain Protein), essentielle à la transduction du signal. Alors que pour TNFR2, l'extrémité cytoplasmique ne contient pas de domaine DD mais va recruter les protéines TRAF1 (TNFR-associated factor 1) et TRAF2 plutôt que TRADD. Dans les deux cas, la liaison du ligand aux récepteurs conduit à un changement conformationnel du récepteur pour permettre la transduction du signal (Brenner *et al.*, 2015).

En 2011, l'équipe de Bellis, qui a montré également le rôle de la sialylation au niveau du récepteur Fas, s'est intéressée à la glycosylation du TNFR1 chez les macrophages. Ils ont tout d'abord surexprimé la ST6Gal-I au niveau de la lignée monocyttaire U937 avant exposition au

PMA qui induit la différenciation des cellules U937 en macrophages, puis l'entrée en apoptose. Suite à l'exposition au PMA, les macrophages surexprimant la ST6Gal-1 rentrent moins en apoptose que les cellules contrôles. Des expériences de co-immunoprécipitation démontrent que le TNFR1 est, comme le récepteur Fas, sialylé en $\alpha 2,6$ au niveau des *N*-glycannes, mais que la sialylation du récepteur disparaît après l'exposition au PMA. Des traitements à la neuraminidase montrent également que la perte de la sialylation augmente l'activité apoptotique du récepteur (Liu *et al.*, 2011).

Plus récemment, deux sites de *N*-glycosylation ont été découverts sur le TNFR1, au niveau des résidus Asn151 et Asn202. L'utilisation de mutants pour ces deux sites indique également que lorsqu'on active le récepteur TNFR1 avec le TNF α , il y a une dégradation moins importante de I κ B α , protéine séquestratrice de NF- κ B. Cela a pour conséquence d'inhiber la voie NF- κ B et la sécrétion de cytokines inflammatoires comme l'IL-1 β , l'IL-10 ou encore le TNF α . Les mutants n'arborant plus de *N*-glycannes sont malgré tout, toujours exportés vers la membrane plasmique. Cependant, la perte de la *N*-glycosylation conduit à un changement conformationnel qui réduit l'affinité du récepteur pour le TNF α (Han *et al.*, 2015).

VI – Activation cellulaire et glycosylation

Comme décrit précédemment, les TLRs font partie des PRRs, qui vont reconnaître des PAMPs, des motifs moléculaires caractéristiques de pathogènes. Les TLRs jouent un rôle très important dans les processus infectieux, la réponse inflammatoire et également dans les maladies auto-immunes. L'intensité de la réponse induite par les TLRs contre un signal de danger peut être contrôlée, et notamment par la glycosylation.

Les premiers travaux sur la régulation des TLRs par la glycosylation ont débuté dans les années 2000, où la protéine MD-2, nécessaire à l'activation de la voie TLR-4 par le LPS, a besoin d'être *N*-glycosylée pour permettre la transduction du signal (Ohnishi *et al.*, 2001). Par la suite, il s'est avéré que le TLR-4 est également *N*-glycosylé et posséderait 9 sites de *N*-glycosylation (Correia and Ulevitch, 2002). Cette glycosylation du TLR-4 est indispensable pour l'expression du récepteur à la membrane plasmique des cellules, mais également nécessaire à la fixation du LPS. Cette perte de glycosylation perturbe également l'interaction du TLR-4 avec son co-récepteur CD14 ce qui affecte directement l'activation de la voie NF- κ B (Correia and Ulevitch, 2002). Il est maintenant connu que la glycosylation de CD14, notamment sa sialylation, participe à la

régulation du TLR4. La perte de la sialylation produit une augmentation de phospho- NF- κ B, forme active du facteur de transcription (Ishida *et al.*, 2014).

La sialylation des récepteurs membranaires peut faire intervenir de nouveaux acteurs impliqués dans la reconnaissance des acides sialiques : les SIGLECs. Il est montré par immunoprécipitation qu'il y a une interaction entre le co-récepteur CD14 et la SIGLEC-3 (CD33) mais pas avec le récepteur TLR-4. Les glycanes sialylés de CD14 vont former une interaction avec la SIGLEC-3, qui va inhiber la présentation du LPS au TLR-4 (Ishida *et al.*, 2014).

Stamatos *et al.* ont observé que l'activation par le LPS des DCs est diminuée en présence d'inhibiteurs de neuraminidases. Ces découvertes mettent en avant une nouvelle fois l'importance de la sialylation dans la réponse immunitaire (Stamatos *et al.*, 2010).

Cette activation de la voie NF- κ B par le récepteur TLR4 peut être également régulée par les glycanes portés par le récepteur TLR4 (Chen *et al.*, 2014). Il est prouvé que le récepteur TLR4 interagit avec la SIGLEC-E murine, homologue de la SIGLEC-9 chez l'homme. Cette interaction entre ces deux protéines membranaires est régulée par l'action de la neuraminidase *NEU1*, mais pas par *NEU3*, l'autre neuraminidase membranaire. Après l'action de *NEU1*, les acides sialiques portés par les différents *N*-glycanes du TLR-4 sont libérés. La désialylation de TLR4 inhibe l'interaction avec la SIGLEC-E, et permet l'activation de la voie TLR4 et la synthèse de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF α ou l'IL-6 (Chen *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2016).

Un autre récepteur, le TLR-2, a été la cible de travaux sur la régulation des TLRs par la glycosylation. Avec des expériences de dichroïsme circulaire couplées à la bioinformatique, quatre sites potentiels de *N*-glycosylation ont été découverts. L'utilisation de mutants prouve que ces quatre sites sont effectivement glycosylés sur les résidus de Asn114, Asn199, Asn414 et Asn442. Ces expériences de mutagenèse dirigée suggèrent que les *N*-glycanes sont impliqués dans la sécrétion du récepteur lorsque celui-ci est exprimé dans des cellules embryonnaires de rein de la lignée 293 (HEK-293) (Weber *et al.*, 2004).

TLR2 est l'un des récepteurs de différents PAMPs, et notamment des lipopeptides mycoplasmiques FSL-1 et LPm. En utilisant toujours des mutants des différents sites et un gène rapporteur, il a été prouvé que les *N*-glycanes ont un rôle dans la reconnaissance des ligands mycoplasmiques. Les mutants des résidus Asn414 et Asn442 ont une activité luciférase beaucoup moins importante lorsqu'ils sont stimulés par les deux ligands mycoplasmiques. Les

deux autres mutants ont une activité luciférase égale ou légèrement inférieure à celle du témoin (Kataoka *et al.*, 2006).

En plus du TLR-4, Ando *et al.* ont montré que la SIGLEC-9 inhibait la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires après stimulation de la lignée RAW264 avec différents ligands spécifiques des TLRs. Après activation des voies TLR-2, TLR-3, TLR-4 et TLR-9, les macrophages sécrètent du TNF α et de l'IL-6. Mais lorsque la SIGLEC-9 est surexprimée dans ces cellules, il y a une perte de la production de ces cytokines pro-inflammatoires, mais une augmentation de l'IL-10, une cytokine anti-inflammatoire. De plus, dans des macrophages activés au niveau de ces mêmes TLRs, la surexpression de la SIGLEC-5 conduit à la même inhibition de cytokines pro-inflammatoires et une augmentation d'IL-10 dans le milieu (Ando *et al.*, 2008).

Dernièrement, il a été montré que le pouvoir anti-inflammatoire de la SIGLEC-9 diminuait lorsque celle-ci était mutée. Des expériences de fractionnement cellulaire ont montré que la SIGLEC-9 migre au niveau des lipides rafts de la membrane plasmique des macrophages après activation de la voie TLR-2 (Ando *et al.*, 2014).

VII – Glycosylation de l'hôte lors d'infections bactériennes

Les maladies infectieuses restent à l'heure actuelle une cause de mortalité majeure, provoquant également une instabilité sanitaire, économique et sociale pour des millions de personnes à travers le monde. La pauvreté, l'absence d'accès aux soins, les flux migratoires, l'émergence de nouvelles pathologies et la résistance aux antibiotiques contribuent à un accroissement des maladies infectieuses. Pour pallier à cette recrudescence, il est primordial de comprendre les mécanismes qui entrent en jeu lors d'une infection virale ou bactérienne. Ce n'est qu'en connaissant les interactions hôtes/pathogènes que l'on pourra mettre en place des stratégies de prévention et de traitements efficaces. Dans cette partie, nous allons développer quelques exemples d'infections où la glycosylation de l'hôte va intervenir dans le processus infectieux, et décrire comment la machinerie de glycosylation peut être modulée par les pathogènes.

A - *Helicobacter pylori* et infection gastrique

L'adhérence à la peau ou aux muqueuses est la première étape de la pathogénicité des agents infectieux. La plupart des microorganismes expriment un ou plusieurs facteurs d'adhérence, appelées « adhésines ». L'infection chronique par *Helicobacter pylori* est une cause reconnue de cancer de l'estomac. L'adhésion bactérienne se fait grâce aux adhésines qui fixent les glycoconjugués présents dans le mucus qui tapisse la surface des épithéliums du tractus gastrique. L'adhésine BabA (Blood group antigen binding Adhesin) reconnaît les épitopes glucidiques de type Lewis B et de type ABH exprimés par les glycoprotéines de l'épithélium, alors que l'adhésine SabA (sialic acid-binding Adhesin) permet la fixation des bactéries en se liant aux motifs sialylés en $\alpha 2,3$, tels que le Sialyl Lewis A et le Sialyl Lewis X portés par les glycosphingolipides et les glycoprotéines. Récemment, une nouvelle adhésine, LabA (LacdiNAC specific Adhesin) a été identifiée comme reconnaissant les motifs de di-N-acétyllactosamine (lacdiNAC), portés par la mucine gastrique MUC5AC (Rossez *et al.*, 2014). La multitude de récepteurs exploités par *Helicobacter pylori* pour adhérer à la muqueuse gastrique reflète la stratégie adoptée par le pathogène pour coloniser efficacement le foyer intestinal et maintenir une infection chronique (Skoog *et al.*, 2012).

Il a été montré que l'interaction entre BabA et le motif Lewis B va permettre la translocation de molécules effectrices de la paroi bactérienne comme le CagA (Cytotoxin-associated gene A) et le peptidoglycane.

La translocation des molécules effectrices, telles que CagA et le peptidoglycane, entraîne l'activation de voies de signalisation intracellulaires de l'hôte (Ishijima *et al.*, 2011). Le résultat de cette activation va être la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, comme l'IL-8 et le TNF α . Le TNF α sécrété active ensuite la voie de signalisation NF- κ B. Il est connu que ces cytokines pro-inflammatoires jouent un rôle dans l'expression des glycosyltransférases impliquées dans la biosynthèse du motif Sialyl Lewis X (Colomb *et al.*, 2014; Delmotte *et al.*, 2002; Groux-Degroote *et al.*, 2008b). Ces conditions inflammatoires vont permettre la synthèse de Sialyl Lewis X à la surface de l'endothélium et favoriser l'interaction avec l'adhésine SabA qui renforce le caractère chronique de l'infection (Magalhães *et al.*, 2015; Marcos *et al.*, 2008).

B – *Francisella tularensis* et infections des ganglions lymphatiques

Francisella tularensis est une bactérie à Gram négatif qui provoque la tularémie, caractérisée par une inflammation au niveau des ganglions lymphatiques. Ce pathogène intracellulaire envahit, survit et se multiplie dans un grand nombre de types cellulaires différents, mais préférentiellement au niveau des macrophages. Après être entré dans le macrophage, le pathogène s'échappe du phagosome pour migrer vers le cytosol où il pourra se multiplier. Il a été montré sur des macrophages THP-1 que l'infection par *F. tularensis* modifie la *O*-glycosylation des macrophages. Des expériences de glycoprotéomique ont montré par MALDI-TOF-TOF que les protéines HSP70 et BiP, impliquées dans la mise en conformation des protéines, étaient *O*-glycosylées après infection (Barel *et al.*, 2016). Dans les cas d'infections pulmonaires ou du tractus gastro-intestinal, la glycosylation varie au niveau membranaire, et notamment les motifs impliqués dans l'adhésion bactérienne. Dans ce cas-là, le rôle de ces variations de glycosylations n'est pas encore établi.

C – Les infections mycobactériennes

Les mycobactéries sont des pathogènes responsables de graves pathologies telles que la tuberculose, la lèpre mais également de maladies opportunistes chez les personnes immunodéprimées. Lors d'une infection, les mycobactéries atteignent l'hôte et sont reconnues et phagocytées par les macrophages alvéolaires. Une fois phagocytés, les bacilles peuvent être détruits rapidement mais dans certains cas ils induisent la formation de granulomes, qui sont des agrégats de cellules immunitaires formant une barrière contre les bacilles tuberculeux. Ces granulomes sont le foyer central de l'infection mycobactérienne car ils permettent la survie et la multiplication du pathogène chez l'hôte (Russell *et al.*, 2010).

Une étude génétique a démontré qu'une mutation au niveau du résidu 168 de la chaîne β du récepteur à l'INF γ (INF γ R2) pouvait induire la création d'un nouveau site de *N*-glycosylation. Ce gain de glycosylation rend le récepteur INF γ R2 inefficace, et induit une susceptibilité des patients aux infections mycobactériennes (Vogt *et al.*, 2005).

Des travaux ont également révélé une modulation de l'expression de certains gènes de la glycosylation dans des macrophages humains infectés par *M. tuberculosis* ou stimulés par des

glycolipides mycobactériens (Silver *et al.*, 2009a). Il a été montré que ces glycolipides stimulent l'expression d'une galactosyltransférase (B4GALT1) et d'une sialidase (Neu4) (Elass-Rochard *et al.*, 2012a; Nau *et al.*, 2002). L'expression ou au contraire la répression de ces gènes de glycosylation semblent indispensables à certains mécanismes de défense des macrophages, tels que l'autophagie, et se trouveraient modifiées en cas d'infection par *M. tuberculosis*, afin de favoriser sa survie intracellulaire (Kumar *et al.*, 2010; Kumar and Rao, 2011a).

Expériences	Gènes régulés	Enzymes	Glycannes modifiés
Macrophages THP-1 infectés par <i>M. tuberculosis</i> H37Rv. (Kumar <i>et al.</i> , 2010; Kumar and Rao, 2011a)	GALNT2 (↑)	N-acétylgalactosaminyltransférase 2	O-glycannes
	FUCA2 (↑)	Alpha-1,6-fucosidase	N-glycannes
	ST8SIA4 (↑)	Polysialyltransférase-1	N-glycannes
Macrophages exposed to <i>M. tuberculosis</i> Erdman (Nau <i>et al.</i> , 2002)	B4GALT1 (↑)	Beta-1,4-galactosyltransférase 1	N-glycannes, O-glycannes, Glycolipides
	GALC (↓)	Galactocéramidase	Glycolipides
Macrophages alvéolaires infectés par <i>M. tuberculosis</i> H37Rv (virulent) et H37Ra (non-virulent) (Silver <i>et al.</i> , 2009a)	FucA1 (↓ avec H37Rv)	Alpha-1,6-fucosidase	N-glycannes
	MAN1A1 (↓ avec H37Rv)	Alpha-1,2-mannosidase	N-glycannes
Macrophages THP-1 activés par le dimycolyl-diarabino-glycerol de <i>M. marinum</i> (Elass-Rochard <i>et al.</i> , 2012a)	B4GALT1 (↑)	Beta-1,4-galactosyltransférase 1	Lactose, N-glycannes, glycolipides
	Neu4 (↑)	N-acetyl-alpha-Neuraminidase 4	O-glycannes
	B3GNT1 (↓)	Beta-1,3-N-acétylglucosaminyltransférase 1	PolyLacNAc N-glycannes

Tableau 4 : Modulation de l'expression des gènes de la glycosylation dans les macrophages humains infectés ou stimulés par des mycobactéries et les glycoconjugués mycobactériens

L'ensemble de ces données suggère qu'au cours d'un processus infectieux, la glycosylation des cellules de l'hôte, en particulier des macrophages, est finement régulée par

l'environnement cellulaire ou par le pathogène, et participe au développement ou à l'inhibition de la réponse immunitaire (Tableau 4). Cependant, malgré ces données de transcriptomique, la glycosylation des macrophages infectés n'a pas été réellement établie. Certaines études ont prouvé que certains marqueurs de surface comme le CD44 arborent plus de motifs Gal β 1,3Gal portés par les O-glycannes (Tang *et al.*, 2017), mais la glycosylation des cellules hôtes après infection n'est pas clairement définie.

Chapitre 4 : L'infection mycobactérienne : notre modèle d'étude pour l'analyse des changements de glycosylation de la cellule hôte

I – Généralités sur les Mycobactéries

Selon la classification actuelle, les mycobactéries sont des organismes du genre *Mycobacterium*, de la famille bactérienne des *Mycobacteriaceae*, de l'ordre des *Actinomycetales*. Ce genre est divisé en plus de 120 espèces appartenant soit aux mycobactéries dites « tuberculeuses » soit aux mycobactéries « non-tuberculeuses » (Tortoli, 2006, 2003). Les mycobactéries sont des agents microbiens responsables de grandes pathologies telles que la lèpre, causée par *Mycobacterium leprae*, ou la tuberculose, due à *M. tuberculosis*.

Les bactéries du genre *Mycobacterium* sont aérobies strictes, non sporulantes, et non motiles, en forme de bâtonnets ou légèrement incurvées appelées bacilles. D'une taille comprise entre 2-5 µm sur 0,3-0,5 µm, elles fixent difficilement la coloration de Gram et sont considérées par défaut comme bactéries à Gram positif. Elles se caractérisent par un génome avec une forte proportion de cytosine et guanine (61-71%), par leur acido-alcool-résistance, la composition en acides mycoliques de leur paroi cellulaire. Grâce à cette propriété d'acido-alcool-résistance de la paroi, il est possible de les différencier de la majorité des autres bactéries avec la coloration de Ziehl-Neelsen, coloration à la base du test diagnostique le plus couramment utilisé pour mettre en évidence une tuberculose.

A – Le Complexe *Mycobacterium tuberculosis*

Les mycobactéries du complexe *Mycobacterium tuberculosis* sont les agents responsables de la tuberculose. Avec plus de 120 espèces décrites, le complexe *M. tuberculosis* regroupe *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. canettii*, *M. bovis*, et *M. microti*. La mycobactérie la plus

souvent à l'origine de la tuberculose humaine est *M. tuberculosis* (*Mtb* ou bacille de Koch). Dans certains cas, la tuberculose humaine peut être causée par d'autres mycobactéries comme *M. bovis*, *M. africanum* et *M. canetti*. Ces mycobactéries sont ensemble responsables de plus de 99% des cas de tuberculose chez l'homme (Figure 25) (Smith *et al.*, 2009).

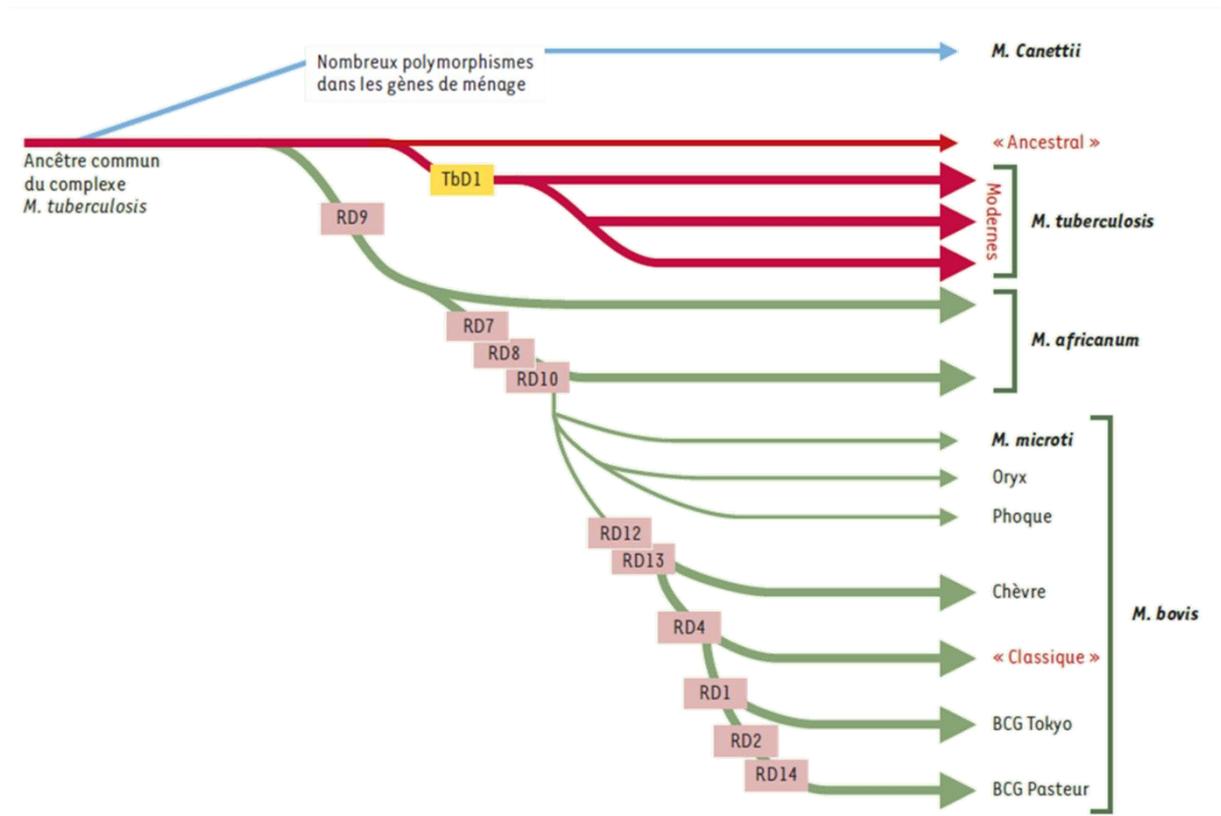


Figure 25 – Evolution du complexe Tuberculosis

Schéma proposé pour l'évolution des bacilles tuberculeux, illustrant les pertes successives d'ADN dans certains lignages. La base du raisonnement est la présence ou l'absence de régions délétées (Tb et RD) (d'après Brosch *et al.*, 2002; Labie, 2003)

M. bovis est l'agent de la tuberculose des bovidés, entraînant des lésions, tuberculeuses primaires pulmonaires et, dans 10% des cas, des lésions des glandes mammaires avec passage du bacille dans le lait. La transmission de *M. bovis* à l'homme peut également s'effectuer par inhalation de particules infectées, présentes notamment dans les étables. Aujourd'hui, la pasteurisation du lait et le contrôle du bétail ont pratiquement éradiqué l'infection humaine à *M. bovis* dans les pays industrialisés, ce qui est loin d'être le cas dans les pays en développement. *M. bovis* peut infecter d'autres mammifères tels que les chats, les chiens ou les caprins.

B – Le modèle *Mycobacterium bovis* BCG

Au début du XXe siècle, la recherche d'un vaccin contre la tuberculose est une problématique rencontrée par les scientifiques à travers le monde. A l'institut Pasteur de Lille, Léon Calmette, bactériologiste, et Camille Guérin, vétérinaire, travaillent sur l'infection tuberculeuse. Ils utilisent comme modèle la souche *M. bovis* obtenue du lait d'une génisse infectée. Au fur et à mesure des passages en culture, les mycobactéries ont perdu peu à peu la virulence à l'égard des jeunes bovins. Treize ans et 230 passages plus tard, ils furent capables de montrer que leur souche avait un rôle protecteur dans leurs modèles animaux, sans causer la moindre infection. C'est la naissance du bacille de Calmette Guérin ou BCG (Lalvani and Sridhar, 2010). En 2000, les progrès de la biologie moléculaire ont permis de comparer les séquences des génomes de *M. tuberculosis* et *M. bovis* BCG. Le bacille de Calmette Guérin possède une homologie de séquence de 99% avec les autres membres du complexe « tuberculosis » (Brosch *et al.*, 2000).

C – Les Mycobactéries atypiques

Les mycobactéries atypiques représentent l'ensemble des espèces qui n'appartiennent pas au complexe *M. tuberculosis* et *M. leprae*. Les mycobactéries sont des agents non pathogènes contre les individus immunocompétents, et sont présents dans tous types d'environnement, aussi bien dans l'air, le sol ou l'eau. Ces mycobactéries atypiques sont généralement des espèces à croissance lente. La principale différence entre les mycobactéries de type *M. tuberculosis* et *M. leprae* avec les mycobactéries atypiques est le caractère peu contagieux de ces dernières qui sont considérées comme opportunistes (Faria *et al.*, 2015).

D – L'enveloppe des mycobactéries

1 – Introduction

L'enveloppe mycobactérienne est remarquable, tant dans sa composition que dans son architecture. Les expériences de microscopie électronique ont permis d'observer différentes couches successives, de densités différentes. L'enveloppe mycobactérienne est composée d'une membrane plasmique entourée de la paroi, qui est elle-même entourée d'une capsule.

La membrane plasmique, qui constitue la première couche de l'enveloppe, est de même composition que celle des autres bactéries. Elle est constituée d'une bicouche lipidique riche en phospholipides et en glycolipides qui s'étendent jusque dans l'espace périplasmique.

Cette enveloppe possède un taux très élevé de lipides compris entre 30-60% de la masse sèche. Les lipides les plus caractéristiques de cette enveloppe sont les acides mycoliques qui confèrent aux mycobactéries la propriété acido-alcool-résistance, et qui permet la coloration de Ziehl-Neelsen (Jankute *et al.*, 2015; Kaur *et al.*, 2009). En dehors des glycolipides et des polysaccharides, la paroi mycobactérienne est également composée de nombreuses lipoprotéines, dont certaines (comme LpqH, LprG, and LprA) sont antigéniques et participent à la virulence de ces pathogènes (Kovacs-Simon *et al.*, 2011).

L'enveloppe mycobactérienne est composée de deux segments, inférieur et supérieur. Au-delà de la membrane plasmique, le peptidoglycane (PGN), analogue à celui des bactéries, est lié de manière covalente à l'arabinogalactane (AG). L'AG est ensuite lié par réaction d'estérification aux acides mycoliques. Tout cela forme le squelette de l'enveloppe mycobactérienne, le complexe mycolyl arabinogalactane peptidoglycane (mAGP). En plus de ce squelette, la paroi mycobactérienne est composée d'autres lipoglycannes à ancre lipidique de type phosphatidyl-myo-inositol. On retrouve entre autres du Phosphatidyl-myo-Inositol Mannoside (PIM), du lipomannane (LM) ou du lipoarabinomannane (LAM) (Figure 26) (Astarie-Dequeker *et al.*, 2010).

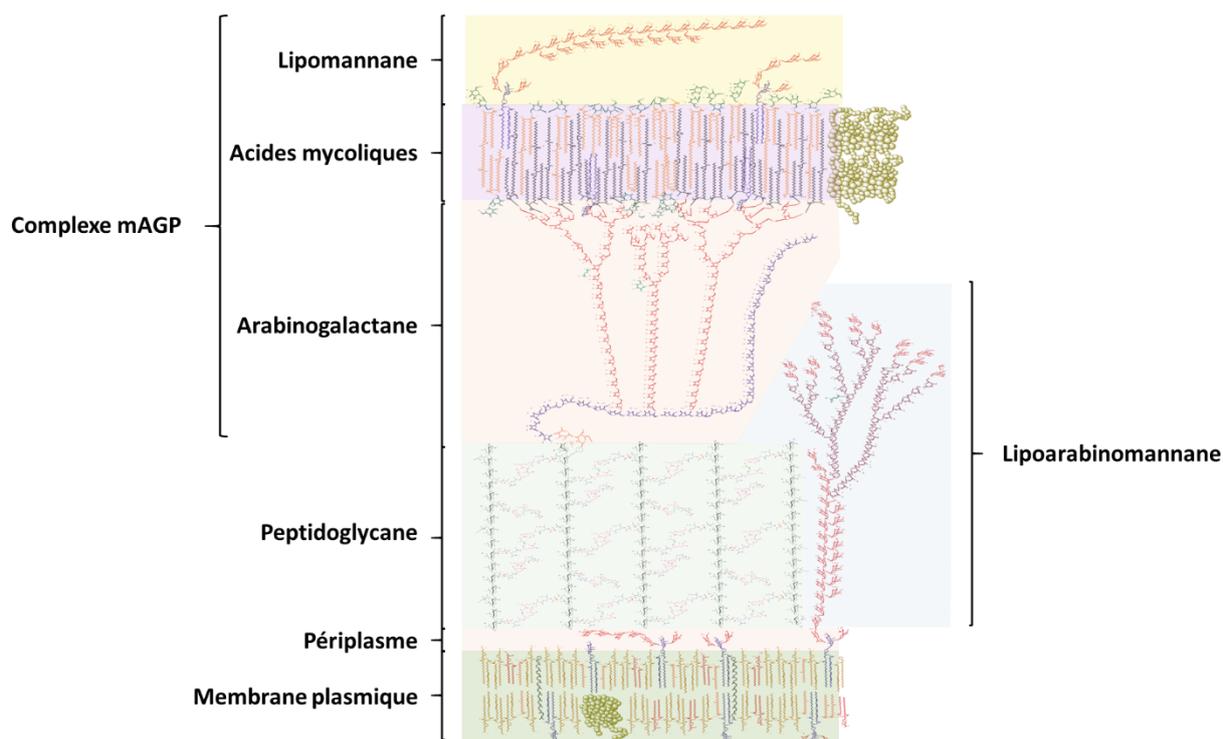


Figure 26 - Représentation de la paroi des mycobactéries (Kaur *et al.*, 2009)

2 – Le peptidoglycane

Le peptidoglycane est un des composants du mAGP. C'est un hétéropolysaccharide commun aux bactéries à Gram négatif et positif, constitué de résidus de GlcNAc et d'acide *N*-acétylmuramique (NAM) liés en β 1,4. Les chaînes de polysaccharide sont reliées entre elles par des chaînes latérales peptidiques de 4 acides aminés liées à la fonction carboxyle du NAM. Le térapeptide est généralement une séquence de L-alanyl-D-isoglucosaminyl-mésodiaminopimétyl-D-alanine avec un acide diaminopimélique amidé. Les chaînes latérales peptidiques de deux chaînes polysaccharidiques différentes forment des ponts peptidiques. Ces ponts peptidiques renforcent la structure du polymère et forment une structure tridimensionnelle stable. Le rôle du peptidoglycane est de donner la forme et la rigidité à la mycobactérie mais également de contrer la pression osmotique. Nécessaire à la croissance et à la survie des bactéries, le peptidoglycane est également la cible des agents thérapeutiques, et particulièrement les enzymes impliquées dans sa biosynthèse.

3 – L'arabinogalactane

L'arabinogalactane est le polysaccharide majeur de la paroi des mycobactéries. Il permet de faire le lien entre le peptidoglycane et la couche d'acides mycoliques. Il est formé de 125 résidus de monosaccharide distribués entre une chaîne galactane constituée de 30 résidus de β -D-galactofuranose et trois chaînes arabinanes de chacune 31 résidus de α -D-arabinofuranose (Figure 27).

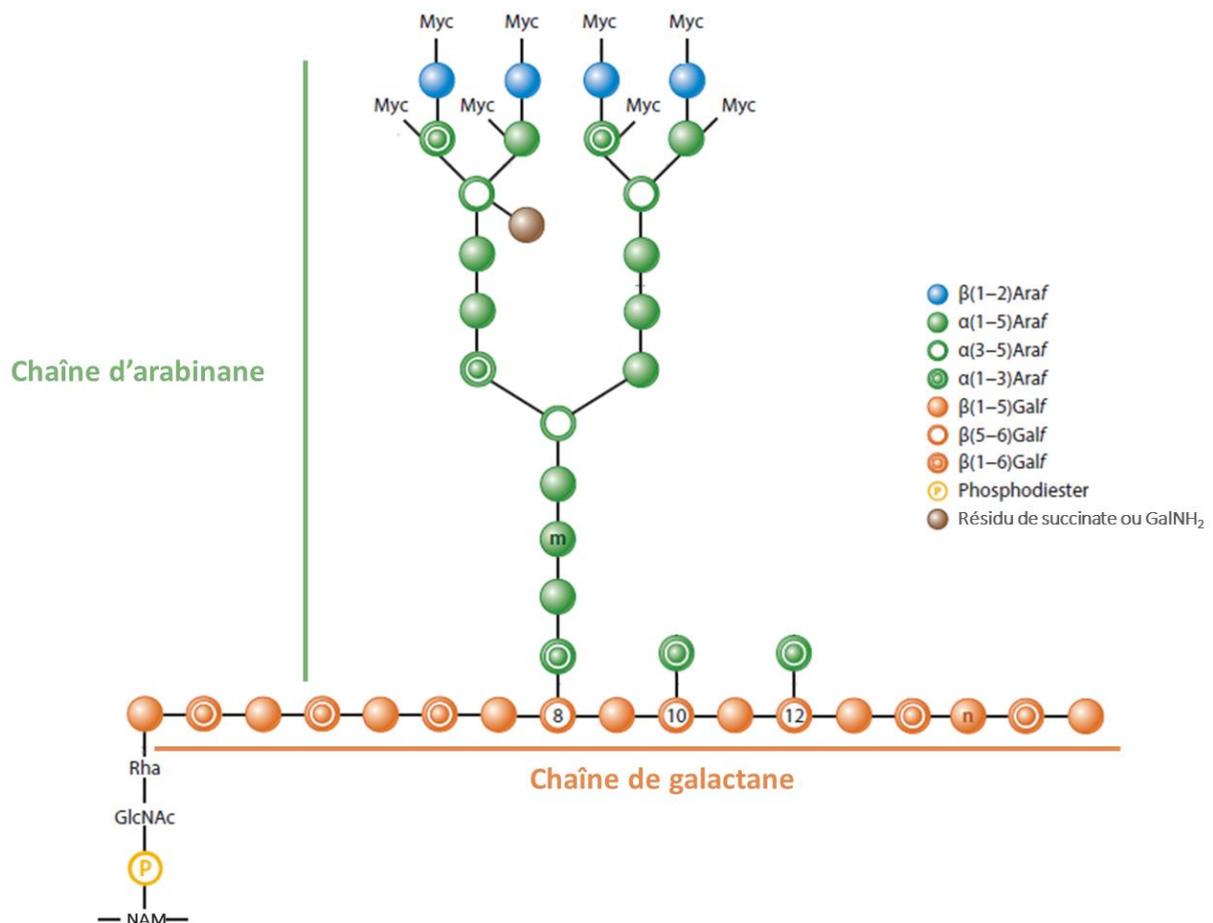


Figure 27 - Représentation schématique de la structure de l'arabinogalactane.

L'arabinogalactane est formé de trois chaînes arabinanes de 31 résidus de galactofuranose liés aux résidus 8, 10 et 12 de la chaîne de bêta-galactane. Les extrémités des chaînes arabinanes servent de point d'ancrage pour les acides mycoliques ; tandis que l'extrémité réductrice de la chaîne galactane est liée au disaccharide [L-Rhap(α 1,3)D-GlcNAc(α 1)] qui forme un pont avec le peptidoglycane (d'après Jankute et al., 2015).

L'extrémité réductrice de l'AG est reliée au PGN par le disaccharide [L-Rhap(α 1,3)D-GlcNAc(α 1)]. La position C1 du résidu de GlcNAc forme une liaison phosphodiester avec la position C6 du NAM. Cette structure est ensuite allongée par 30 résidus de galactofuranose en alternant

des liaisons en β 1,5 et β 1,6. Sur cette chaîne linéaire de galactane, on trouve en position 8, 10 et 12, trois chaînes d'arabinane d'environ 30 résidus chacune et liées à la chaîne de galactane sur la position C5 des résidus β 1,6 de galactofuranose. Les résidus d'arabinofuranose sont liés en α 1,5 avec des points de branchements en position C3. L'extrémité non réductrice des chaînes d'arabinane forme un motif de 6 résidus [D-Araf(β 1,2)-D-Araf]₂(α 3,5)D-Araf-(α 1,5)D-Araf] avec les acides mycoliques attachés en position C5 des deux extrémités β -D-Arabinofuranose terminaux et des deux α -D-Arabinofuranose qui les précèdent (Figure 27) (Jankute *et al.*, 2015; Kaur *et al.*, 2009).

4 – Les acides mycoliques

Les acides mycoliques sont la troisième famille de molécules intervenant dans la composition du mAGP. Ils sont liés majoritairement à l'AG et forment une membrane externe asymétrique dont le feuillet interne est formé par les acides mycoliques et le feuillet externe par un ensemble de lipides, glycolipides et protéines. Ils peuvent également être couplés à d'autres formes de lipides comme les tréhaloses mono-, di- et tri-mycolates (TMM, TDM, TTM). Les acides mycoliques sont des acides gras à longues chaînes de 60 à 90 carbones, α -alkylés et β -hydroxylés. Ils sont composés de deux chaînes alkylées, la chaîne α saturée (C24-C26) et la chaîne méromycolate (C42-C62). La chaîne α est constante dans l'ensemble des espèces de mycobactéries, à l'exception d'une faible variation de la longueur de la chaîne. La structure de la chaîne méromycolate est plus aléatoire, car elle peut porter des groupements fonctionnels localisés en position dite distale et proximale par rapport à la fonction carboxylique. Les groupements greffés peuvent être de types alkyles, carbonyles, cyclopropanes, acides carboxyliques, mais il peut s'agir également d'insaturation. Les acides mycoliques les plus abondants dans l'enveloppe de *M. tuberculosis* sont les α -mycolates, caractérisés par une fonction cyclopropane en position proximale et distale de conformation cis. Les autres espèces d'acides mycoliques sont : les méthoxy-, les céto et les hydroxy-mycolates. Ces trois types d'acides mycoliques se distinguent des α -mycolates par la présence d'une fonction oxygénée en position distale sur leur chaîne méromycolique (Watanabe *et al.*, 2002, 2001).

5 – Les glycolipides de type phosphatidylinositol

Après la couche d'acides mycoliques, beaucoup de structures mannosylées sont présentes à la surface de l'enveloppe. Le PIM, le LM le LAM sont des lipoglycannes dérivés du PI. Le LAM peut également porter une coiffe mannosylée et donner le Man-LAM. Le PIM est un glycolipide composé d'une unité de phosphatidyl-myo-inositol (PI), de un à six résidus α -D-mannopyranose (Manp) et de une à quatre chaînes acylées. Le PI est glycosylé avec des résidus de α -Manp aux niveaux des groupements hydroxyyles en C2 et C6 du myo-inositol conduisant à la formation de l'ancre MPI (mannosyl phosphate inositol) (Figure 28).

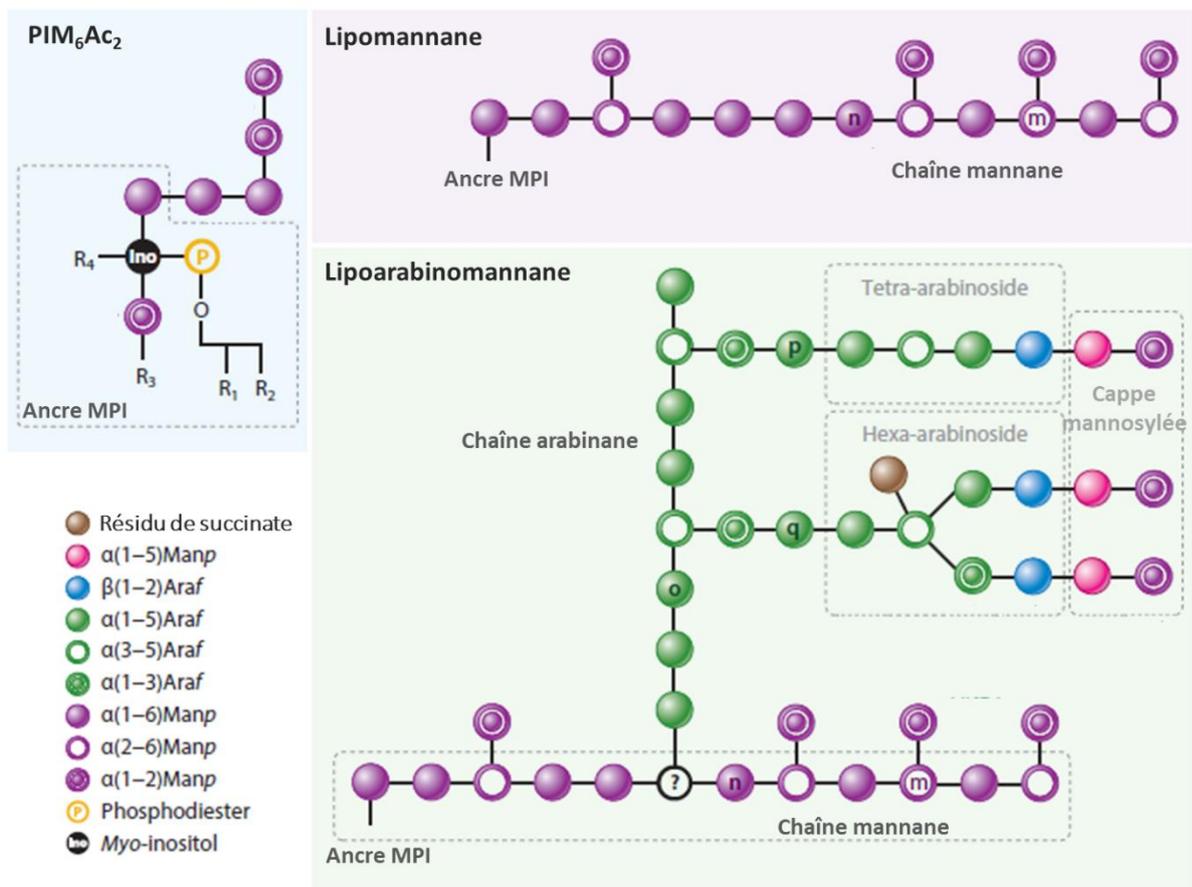


Figure 28 - Représentation schématique du phospho-myo-inositol hexamannoside tétra-acylé, du lipomannane et du lipoarabinomannane

Quatre sites d'acylation sont disponibles sur l'ancre MPI: les groupements hydroxyyles en position C1 et C2 du glycérol, en position C3 du myo-inositol et en position C6 du résidu de Manp lié au myo-inositol en position C2. Les espèces les plus abondantes de PIM dans les mycobactéries sont les PIM₂ (phospho-myo-inositol dimannosides) tri- et tétra-acylés, (respectivement PIM₂Ac₁ et PIM₂Ac₂) et les PIM₆ (phospho-myo-inositol hexamannosides) tri-

et tétra-acylés (respectivement PIM₆Ac₁ et PIM₆Ac₃) (Gilleron *et al.*, 2003; Jankute *et al.*, 2015). L'ancre MPI est substituée par une chaîne de mannane d'environ 21 à 34 résidus de Manp liés en α1,6 décorée tous les 5 à 10 résidus par un résidu de mannose en α1,2, et ainsi forme le LM. La chaîne mannosylée sert ensuite de substrat pour fixer une chaîne de 55 à 72 résidus d'Araf, pour donner le LAM. Le domaine arabinane contient une seule chaîne linéaire de Araf liée en α1,5 avec des branches en 3,5 (Birch *et al.*, 2010). L'extrémité non réductrice du domaine arabinane de la LAM se termine soit par un hexa-arabinoside ramifié {[β-D-Araf-(α1,2)D-Araf]₂-(α3,5)D-Araf-(α1,5)D-Araf]} ou un tétra-arabinoside linéaire [β-D-Araf-(α1,2)D-Araf-(α1,5)D-Araf-(α1,5)D-Araf]. Ces extrémités non réductrices des chaînes arabinanes peuvent être aussi coiffées de résidus de Manp liés en α1,2 et former ManLAM. Enfin, de façon similaire à l'AG, un résidu de succinate est identifié en position C2 de certains résidus internes de α3,5-D-Araf (Kaur *et al.*, 2008).

6 – Les autres lipides

L'enveloppe mycobactérienne est composée d'une autre catégorie de lipides dits "extractibles". Ceux-ci sont, vraisemblablement pour la majorité d'entre eux, localisés dans le feuillet externe de la mycomembrane. Contrairement aux acides mycoliques estérifiés sur le squelette d'AG, ces lipides ne sont associés à l'enveloppe qu'au travers d'interactions hydrophobes. Ces lipides "libres" sont dits "extractibles" parce qu'ils ont la propriété de pouvoir être extraits par des solvants organiques. D'une espèce mycobactérienne à une autre, la composition globale de l'enveloppe en lipides extractibles peut être très variable. Chez *M. tuberculosis*, on retrouve au déla du mAGP des glycolipides avec un noyau tréhalose tels que les tréhaloses di-mycolates (TDM), les di-acyltréhaloses (DAT), les tri-acyltréhaloses (TAT), poly-acyltréhaloses (PAT) et les sulfatides (SL).

II – Cycles infectieux des mycobactéries tuberculeuses

A – La tuberculose

1 – Présentation

En 1993, l'OMS (organisation mondiale de la santé) a placé la tuberculose comme une urgence mondiale. La tuberculose est une des premières causes mondiale de mortalité par maladies infectieuses, avec le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et le paludisme. En 2015, 1,4 millions de personnes sont décédées après une infection par *M. tuberculosis* et 0,4 millions de décès supplémentaires pour des cas de tuberculose opportuniste chez les personnes atteintes du VIH. Cette même année, l'OMS a dénombré plus de 10,4 millions de nouveaux cas de tuberculose (World Health Organization, 2016).

Selon les estimations, le nombre de personnes développant la tuberculose chaque année est en diminution, bien que cette diminution soit très lente. Entre 1990 et 2012, le taux de mortalité par tuberculose a chuté de 45 % grâce à l'utilisation de médicaments antituberculeux, ces derniers s'attaquant principalement à la biosynthèse de composés spécifiques présents dans la paroi bactérienne. Par exemple, la biosynthèse de l'arabinogalactane est inhibée par l'éthambutol, la benzothiazinone et la dinitrobenzamide tandis que celle des acides mycoliques est inhibée par l'isoniazide et l'ethionamide (Belanger *et al.*, 1996; Goude *et al.*, 2009). Cependant, ces traitements perdent en efficacité en raison de l'apparition de souches résistantes. Selon le nombre de médicaments auquel résiste le pathogène, il s'agit de tuberculose multirésistante (Multiple Drug Resistance, MDR), résistance à au moins l'isoniazide et la rifampicine ou ultrarésistante (eXtensively Drug Resistant, XDR), résistance à pratiquement tous les antituberculeux.

Selon une autre étude de l'OMS, 9,3 % des cas de MDR sont en réalité des cas de XDR. C'est pour cela que régulièrement, des recherches fondamentales sont effectuées afin de comprendre le mécanisme d'action des agents anti-TB courants et de trouver de nouvelles cibles pharmacologiques permettant la synthèse de nouveaux médicaments.

2 – Cycle infectieux de la tuberculose

La tuberculose se transmet d'une personne à une autre par voie aérienne après qu'un individu infecté expectore des bacilles (crachat, toux) vers un individu sain. Les bacilles tuberculeux sont transportés par de fines gouttelettes en suspension. Ces bacilles arrivent dans les poumons jusqu'au niveau des alvéoles pulmonaires. Les bacilles interagissent avec les cellules du système immunitaire de l'hôte. Après phagocytose par les macrophages alvéolaires, les mycobactéries qui ont survécu vont ensuite se multiplier à l'intérieur de ces cellules. Chez les enfants et les personnes immunodéprimées, une tuberculose primaire peut se développer après la dissémination des bacilles dans l'organisme mais son occurrence ne dépasse pas les 5 %.

Dans une grande majorité des cas, une réponse immunitaire adaptative se met en place, conduisant à la formation d'un agrégat cellulaire organisé : le granulome. Ce granulome sert normalement à contenir les bacilles en attente de leur destruction. Mais sa fonction est détournée par *M. tuberculosis* pour en former une structure protectrice, permettant de se multiplier. Au centre du granulome se trouvent les macrophages infectés et des cellules géantes (fusion de macrophages), entourés de macrophages spumeux (gorgés de lipides) et de cellules épithéloïdes (macrophages différenciés) (Figure 29) (Russell *et al.*, 2010).

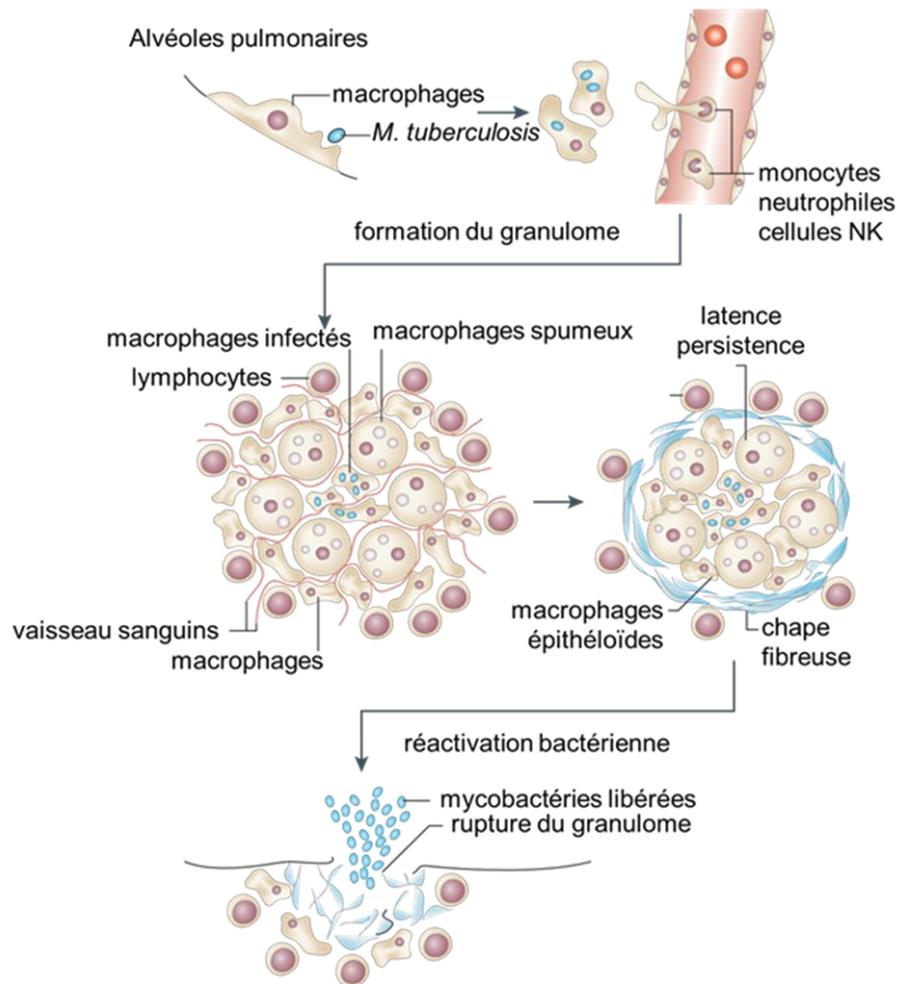


Figure 29 - Cycle de vie des mycobactéries tuberculeuses

L'infection débute lorsque des bacilles *M. tuberculosis* sont inhalés et phagocytés par des macrophages alvéolaires. La réponse pro-inflammatoire induite conduit au recrutement de monocytes de la circulation, ainsi qu'à une néo-vascularisation du site d'infection. Les macrophages qui forment le granulome se différencient en cellules épithéloïdes, cellules géantes multi-nucléées et macrophages spumeux. Le granulome forme par la suite une chape fibreuse de matrice extracellulaire à l'extérieur de la couche de macrophages. En périphérie, le granulome est composé d'une couche lymphocytaire. La progression vers la maladie se caractérise par une perte de vascularisation, une augmentation de la nécrose et l'accumulation de caséum dans le centre du granulome. Il en résulte que les mycobactéries ne peuvent plus être contenues par les granulomes et sont disséminées dans tout l'organisme après la rupture du granulome (d'après Russell *et al.*, 2009).

En périphérie, le granulome est composé essentiellement d'un manteau de cellules lymphocytaires. Le granulome évolue ensuite par un processus de néo-vascularisation et par la production d'une chape fibreuse composée principalement de collagène qui sépare le centre du granulome de sa périphérie. L'infection est donc asymptomatique et très difficile à éradiquer.

Chez les personnes immunodéprimées, les bacilles qui se sont multipliés au sein du granulome vont être réactivés. Dans environ 10% des cas, cela entraîne la rupture du granulome et la dissémination des mycobactéries dans l'organisme. L'infection redevient symptomatique et de nouveau contagieuse. L'accumulation de matériel lipidique dans les poumons conduisant à la multiplication des bacilles, suivie d'une obstruction des bronches et aussi plus fréquemment, d'une insuffisance respiratoire sont des caractères principaux de cette tuberculose secondaire.

B – Principales étapes du processus infectieux

1 – Interaction des mycobactéries avec le système immunitaire

Lors d'une infection mycobactérienne, les différents composants de la paroi des mycobactéries interagissent avec les nombreux récepteurs du système immunitaire, notamment présents à la surface des cellules dendritiques et des macrophages alvéolaires. Les macrophages alvéolaires constituent les cellules les plus abondantes dans les lavages broncho-alvéolaires (90%). Ils entretiennent l'environnement alvéolaire, détruisent les débris cellulaires, les cellules mortes et les bactéries. Ces macrophages sont dérivés de monocytes circulants qui ont migré vers les poumons, mais ils peuvent également être originaires de macrophages pulmonaires en réponse à une inflammation. Les macrophages alvéolaires doivent jongler entre une activité pro- ou anti-inflammatoire lors d'une réponse immunitaire pour ne pas endommager l'environnement pulmonaire. Ils exposent donc des phénotypes de type M1/M2. Ces cellules présentent un fort taux de MR à leur surface, caractéristique d'une activité phagocytaire importante, par contre ils présentent peu de molécules co-stimulatrices de type CD80 et CD86, ce qui montre qu'ils ont une faible présentation d'antigènes. En plus d'infecter les macrophages, les mycobactéries vont interagir avec les cellules dendritiques, principalement au niveau du DC-SIGN qui va permettre leur phagocytose. Une fois les mycobactéries internalisées, les DCs vont pouvoir présenter les différents antigènes aux cellules T CD4 naïves (Mihret, 2012; Schorey and Schlesinger, 2016).

2 – Phagocytose des mycobactéries par les macrophages et les cellules dendritiques

La première étape dans l'infection mycobactérienne correspond à la reconnaissance du pathogène par les cellules de l'immunité innée. La phagocytose des mycobactéries commence par la fixation des différents PAMPs mycobactériens par les PRRs (Mishra *et al.*, 2017).

Les MRs présents à la surface des macrophages vont cibler les ligands mannosylés de la paroi des mycobactéries comme les capes mannosylées du ManLAM ou encore les résidus de mannose portés par le PIMs. La fixation des ligands mannosylés aux MRs conduit à la phagocytose des mycobactéries (Kang *et al.*, 2005; Astarie-Dequeker *et al.*, 1999; Schlesinger *et al.*, 1996). La perte de ManLAM ainsi que la diminution de PIM dans la paroi mycobactérienne de *M. tuberculosis* montrent un défaut de phagocytose des macrophages associé à une diminution de l'affinité des mycobactéries pour le MR (Shimada *et al.*, 2006; Torrelles *et al.*, 2008).

Cependant, il a été montré que le MR n'est pas un récepteur « professionnel » lié à la phagocytose mais que celui-ci dépendrait d'un co-activateur pour induire la phagocytose (Le Cabec *et al.*, 2005) Bien que le MR soit le récepteur majoritaire des mycobactéries sur les macrophages, il n'a qu'un très faible rôle dans l'interaction entre les mycobactéries et les cellules dendritiques (Tailleux *et al.*, 2003). Geijtenbeek *et al.* ont démontré que le DC-SIGN reconnaît le ManLAM de *M.tuberculosis* et de *M. bovis BCG* et induit leur phagocytose accompagnée d'une sécrétion d'IL-10 (Ehlers, 2010; Geijtenbeek *et al.*, 2003).

3 – Inhibition de la formation du phagolysosome

Les mycobactéries phagocytées se retrouvent dans un compartiment cellulaire : le phagosome. D'ordinaire, le phagosome va fusionner avec un autre compartiment cellulaire, le lysosome, et former le phagolysosome. Ce phagolysosome est caractérisé par un pH plus acide et des agents microbicides. Mais lors d'une infection mycobactérienne, les pathogènes inhibent la fusion du phagosome avec le lysosome en bloquant le pH du phagosome à pH6.5 (Sturgill-Koszycki *et al.*, 1994). Les mycobactéries contenues dans les endosomes peuvent interagir avec les récepteurs de ces mêmes endosomes. Malgré la phagocytose de mycobactéries virulentes (*M. smegmatis*) ou non virulentes (*M. kansasii*), la voie de

maturation du phagosome peut être court-circuitée en empêchant la production de radicaux oxygénés et la fusion du phagosome avec le lysosome, et ainsi garantir l'entrée du pathogène dans la cellule sans le détruire (Astarie-Dequeker *et al.*, 1999). Ces interactions modulent les voies de signalisation intracellulaires afin d'inhiber la fusion de phagolysosome. Il a été prouvé que le PIM et ManLAM de *M. tuberculosis* inhibent la formation du phagolysosome à travers le MR alors que le LAM sans coiffe mannosylée n'inhibe pas cette fusion (Kang *et al.*, 2005; Shimada *et al.*, 2006; Torrelles *et al.*, 2006). Le ManLAM inhibe le flux calcique cytosolique, nécessaire à la maturation du phagosome, en inactivant la sphingosine kinase (Fratti *et al.*, 2003; Malik *et al.*, 2003; Vergne *et al.*, 2003). Enfin, des travaux récents ont montré qu'une lipoprotéine mycobactérienne, LprG, se lie au ManLAM et contrôle sa distribution au niveau de l'enveloppe mycobactérienne. Les mutants de *M. tuberculosis* dépourvus de LprG exposent moins de ManLAM à leur surface et sont donc moins efficaces pour inhiber la fusion phagolysosome (Gaur *et al.*, 2014; Shukla *et al.*, 2014).

4 – Régulation de la sécrétion des cytokines inflammatoires

Précédemment, nous avons vu que les TLRs étaient exprimés à la surface des cellules immunitaires et que l'activation de ces récepteurs conduisait à la mise en place de la réponse immunitaire, en particulier une réponse inflammatoire par la voie NF- κ B. Les TLRs sont connus pour être impliqués dans la reconnaissance de *M. tuberculosis*, et plus particulièrement TLR2, TLR4 et TLR9. (Basu *et al.*, 2012)

De nombreuses études ont montré que TLR2 est impliqué dans la réponse immunitaire innée lors d'une infection mycobactérienne. TLR2 forme un hétérodimère soit avec TLR1, soit TLR6. L'hétérodimère TLR2/TLR1 permet la reconnaissance de lipopeptides triacylés, des lipoglycannes PIM, LM et ManLAM mais également de lipoprotéines de la paroi comme les lipoprotéines 19-kDa et 38-kDa (Brightbill *et al.*, 1999; Ellass-Rochard *et al.*, 2012b; Noss *et al.*, 2001; Quesniaux *et al.*, 2004; Vignat *et al.*, 2003). Cette reconnaissance des ligands par TLR2 permet la fixation de la protéine adaptatrice Myd88, et ainsi le recrutement des protéines nécessaires à l'activation des voies NF- κ B et à la production de cytokines inflammatoires. Cette année, Blanc *et al.* ont prouvé que *M.tuberculosis* synthétisait des sulfoglycolipides, inhibiteur de TLR2, capable d'inhiber l'activation de la voie NF- κ B et la production d'IL-8 dans les macrophages infectés (Blanc *et al.*, 2017).

Au début des années 2000, des études ont montré que le récepteur TLR4 était, comme TLR2, impliqué dans la réponse inflammatoire (Jones *et al.*, 2001; Means *et al.*, 2001, 1999). Le récepteur TLR4 est activé par la protéine HSP (Heat Shock Protein) 65/70. (Bulut *et al.*, 2005) Des études *in vivo* montrent que des souris déficientes en TLR4 produisent moins de TNF α . De plus, chez ces mêmes souris, il a été montré que l'infection par *M. tuberculosis* diminuait la survie lorsque TLR4 n'est pas exprimé.

Le LM et le ManLAM de *M. tuberculosis* sont principalement reconnus par le TLR2, et le LM légèrement par le TLR4. L'activation des macrophages par ces deux glycolipides induit la sécrétion d'IL-12 (Dao *et al.*, 2004). Le même ManLAM de *M. tuberculosis* induit la sécrétion d'IL-8 au niveau des macrophages, par interaction avec le MR et non pas avec TLR2 (Rajaram *et al.*, 2010). Au niveau des cellules dendritiques, les ManLAM de *M. tuberculosis* et de *M. bovis BCG* ont un effet anti-inflammatoire car ils inhibent la production d'IL-12, notamment grâce à leur affinité pour le MR. L'interaction avec le DC-SIGN induit en parallèle la sécrétion d'IL-10 qui renforce le caractère anti-inflammatoire. La cape mannosylée du LAM est indispensable pour induire ce phénomène anti-inflammatoire, par contre le degré d'acylation n'influence pas l'immunogénicité du lipoglycane (Gagliardi *et al.*, 2005; Geijtenbeek *et al.*, 2003; Nigou *et al.*, 2001).

Certaines lipoprotéines de la paroi induisent également une réponse inflammatoire, c'est le cas de deux lipoprotéines 19-kDa et 38-kDa. La lipoprotéine 38-KDa est un ligand de TLR2 et TLR4 et activateur de la voie MAPK. Cette activation permet la sécrétion de TNF α et d'IL-6 (Jung *et al.*, 2006). La lipoprotéine 19-KDa est un ligand de TLR2 et a une activité pro-inflammatoire car elle induit la sécrétion de TNF α , d'IL-1 β et d'IL-6 (Liu *et al.*, 2015; Stewart *et al.*, 2005).

En conclusion, l'infection mycobactérienne induit une forte réponse inflammatoire au niveau des cellules de l'immunité innée. Les différents composés de la paroi interagissent avec les PRRs de la membrane plasmique et induisent une première réponse pro-inflammatoire via les différents TLRs. Cette réponse pro-inflammatoire peut être contrebalancée soit par la production de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10, ou en sécrétant des sulfoglycolipides inhibiteurs des TLRs. Cet environnement inflammatoire peut induire des variations du génome dans le but de réguler la réponse immunitaire.

Objectifs

Les cellules de l'immunité innée jouent un rôle central dans la reconnaissance et la destruction du pathogène, le recrutement de l'immunité adaptative. Les études portant sur la glycosylation de ces cellules et des récepteurs de l'immunité suggèrent un rôle primordial des glycanes (*i.e.* glycolipides, *N*- et *O*-glycanes) dans de nombreux processus immunologiques (van Kooyk and Rabinovich, 2008). Les variations d'expression de certains gènes d'enzymes de glycosylation, mises en évidence dans des macrophages infectés par des mycobactéries ou stimulés par leurs composés pariétaux (Kumar *et al.*, 2010; Silver *et al.*, 2009a), suggèrent des remaniements dans les profils de glycosylation de ces cellules. Dans ce contexte, le but du projet est d'identifier les changements de glycosylation des macrophages induits par *Mycobacterium bovis BCG* ou par des composants dérivés de la paroi, afin à plus long terme d'analyser l'influence de ces changements dans la pathogénicité. L'apparition de nouvelles structures glycaniques pourrait constituer alors un facteur important de régulation des propriétés cellulaires en termes d'activation, de prolifération et de migration, au cours de l'infection mycobactérienne. Ces « nouveaux » glycanes pourraient également servir de ligands pour les lectines du pathogène favorisant son invasion et/ou pour les lectines des (autres) cellules immunitaires impliquées dans les interactions cellule-cellule et dans la communication entre l'immunité innée et l'immunité adaptative.

La première partie de notre projet est de mettre en place une méthodologie d'analyse de la glycosylation des cellules immunitaires. Comme modèle cellulaire, nous utilisons la lignée leucémique pro-monocytaire THP-1 qui après différenciation au PMA (Phorbol myristate acetate) présente un phénotype de type macrophagique. Cette étape de différenciation induit des changements de la glycosylation cellulaire, que nous avons cherché à caractériser.

Nous devons extraire les glycoconjugués (*N*-glycanes, *O*-glycanes, GSLs) via des méthodes chimiques et enzymatiques, les purifier avant de les analyser par spectrométrie de masse. Une fois ces changements de glycosylation mis en évidence, nous déterminerons les variations de l'expression d'épitopes glycaniques à la surface cellulaire grâce à l'utilisation de lectines végétales et de la cytométrie en flux

Ces variations glycaniques sont les résultats de différences d'expression des gènes d'enzymes de la glycosylation (glycosyltransférases et glycosidases). Par la suite, il est donc important de déterminer ces variations d'expressions de gènes par RT-qPCR, en collaboration

avec le Dr. Sophie Groux-Degroote dans l'équipe « Régulation de la glycosylation terminale » (UGSF, UMR8576 CNRS), dirigée par le Dr. Anne Harduin-Lepers (DR2 CNRS).

Dans un second temps, nous avons voulu mettre en évidence les variations de glycosylation des macrophages infectés par *Mycobacterium bovis BCG* ou activés par des composants pariétaux mycobactériens. Les macrophages THP-1 sont infectés par les mycobactéries et nous avons appliqué la méthodologie développée précédemment. Après avoir utilisé la lignée THP-1, notre étude s'étend sur des cultures primaires de monocytes de sang différenciés en macrophages M1 par le GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor). Enfin, nous avons commencé une étude sur l'infection par *Mycobacterium bovis BCG* sur des cellules dendritiques de souris dérivées de la moelle osseuse.

Résultats et discussions

Chapitre 1 : Etude des variations de glycosylation lors de la différenciation de la lignée monocyttaire THP-1 en macrophages

I – Introduction

Les macrophages et leurs précurseurs, les monocytes, appartiennent aux cellules de l'immunité innée. Les macrophages sont des cellules phagocytaires qui jouent un rôle clé dans l'homéostasie tissulaire et la défense immunitaire. Ils participent à la reconnaissance de pathogènes étrangers comme les bactéries, les champignons ou encore les virus. Cette reconnaissance se fait entre les motifs moléculaires des pathogènes (PAMPs) et les récepteurs de ces motifs (PRRs) présents au niveau des cellules de l'immunité. Suite à cette détection, les monocytes et les macrophages sécrètent des cytokines et des chimiokines pro-inflammatoires ou encore des radicaux oxygénés. Cette sécrétion va permettre le recrutement d'autres cellules immunitaires au niveau du site infectieux dans le but de contrôler la propagation du pathogène.

La lignée cellulaire THP-1 a été initialement isolée à partir de sang d'un patient mâle âgé d'un an, atteint de leucémie monocyttaire (Tsuchiya *et al.*, 1980). Cette lignée est couramment utilisée dans l'étude des phénomènes immunologiques. Ces dernières décennies, la lignée THP-1 est devenue l'une des lignées les plus utilisées dans l'étude de l'implication des monocytes/macrophages dans le cancer, les maladies cardiovasculaires et les maladies infectieuses (Auwerx, 1991; Chanput *et al.*, 2014; Mendoza-Coronel and Castañón-Arreola, 2016). De plus, le faible nombre de cellules et l'hétérogénéité des macrophages obtenus à partir de biopsies ou de poches de sang sont des obstacles dans l'analyse des propriétés de ces cellules.

Après incubation avec un ester de phorbol, le PMA (Phorbol 12-myristate 13-acétate), les cellules THP-1 se différencient en cellules « macrophages-like » qui présentent des propriétés similaires aux macrophages obtenus à partir de culture primaire. En effet, en réponse au PMA, les cellules THP-1 présentent une forte activité phagocytaire, un phénotype d'adhésion, une

résistance à l'apoptose et des marqueurs de surface exprimés également au niveau des macrophages primaires (Kohro *et al.*, 2004; Prieto *et al.*, 1994; Schwende *et al.*, 1996). Plattner *et al.* ont signalé des changements importants dans la fixation de lectines végétales à la membrane des cellules THP-1 après une différenciation induite par le PMA. Ces changements de fixation de lectines suggèrent une altération de la glycosylation membranaire (Plattner *et al.*, 2009). Plus récemment, il a été démontré que la différenciation par le PMA perturbait la dynamique de sialylation au sein de ces mêmes cellules différenciées. Ces travaux ont montré des taux variables de sialylation en $\alpha 2,3$ et $\alpha 2,6$ lors de la différenciation et la polarisation des macrophages vers un phénotype M1 ou M2 (Wang *et al.*, 2016). Néanmoins, jusqu'à présent, aucune étude structurale fine n'a démontré la nature exacte de ces changements. Sur la base de ces observations, le but de cette première partie est d'analyser finement les changements de glycosylation induits lors de la différenciation des cellules monocytaires THP-1 en macrophages. Les différents glycoconjugués (glycosphingolipides, *N*-glycannes et *O*-glycannes) de ces deux types cellulaires sont libérés et purifiés individuellement. Les profils glycomiques de ces cellules sont analysés par spectrométrie de masse et cytométrie en flux, et les changements de glycosylation liés à la différenciation ont été corrélés avec des mesures d'expression des glycosyltransférases et des glycosidases impliquées dans le métabolisme de la glycosylation.

II - Résultats

A – Caractérisation des marqueurs de surface des macrophages

Suite à la différenciation par le PMA des cellules THP-1 en macrophages, les cellules acquièrent des propriétés d'adhérence et un phénotype similaire à celui des macrophages (Tsuchiya *et al.*, 1982). Cette différenciation des monocytes en macrophages induit l'apparition de nouveaux marqueurs membranaires (Mittar *et al.*, 2011). L'étude de Mittar et collaborateurs a permis de mettre en évidence 21 marqueurs (CD9, CD11a, ...) exprimés dans les deux types cellulaires, 23 marqueurs (sCD15, CD35, ...) exprimés exclusivement sur les monocytes THP-1 et 20 marqueurs (CD11b, CD11c, ...) exprimés exclusivement sur les macrophages THP-1. Pour contrôler l'état de différenciation des monocytes en macrophages, le taux d'expression de l'intégrine CD11c est quantifié par cytométrie en flux. Comme le montre la Figure 30, le CD11c n'est pas détecté à la surface des monocytes THP-1. En revanche, une expression importante de ce marqueur est visible suite à la différenciation par le PMA.

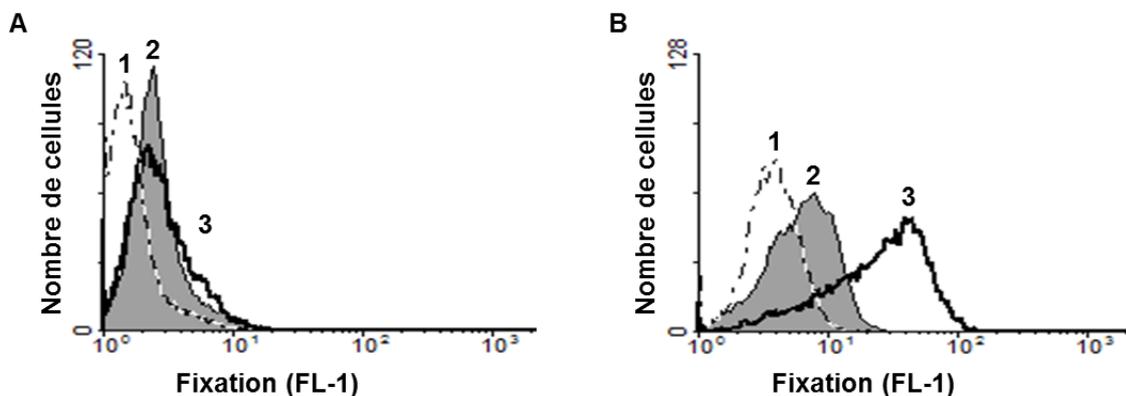


Figure 30 - Expression du marqueur CD11c après différenciation des monocytes THP-1 en macrophages, par le PMA.

Les cellules monocytaires THP-1 n'ont pas été traitées (A) ou incubées avec 20 nM de PMA (B). Après 72h d'incubation, le niveau d'expression du marqueur CD11c quantifié par cytométrie en flux grâce à un anticorps spécifique anti-CD11c. Ces résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes. (1) : autofluorescence ; (2) : isotype contrôle ; (3) : Anti-CD11c.

Une fois cette différenciation confirmée, nous avons caractérisé les différents profils de glycosylation de ces deux types cellulaires. Pour cela, les différents glycoconjugués que sont les glycosphingolipides, les *N*-glycannes et les *O*-glycannes ont été isolés et purifiés avant

d'être analysés en spectrométrie de masse. Dans un premier temps, les glycosphingolipides et les glycoprotéines sont séparés après extraction par des solvants organiques.

B – Extraction et purification des glycannes

Au cours de ce projet, il a fallu mettre en place une stratégie d'analyse du glycome des cellules. Nous avons utilisé plusieurs protocoles pour l'analyse des différents glycoconjugués. Pour l'étude des glycosphingolipides, une extraction organique est nécessaire pour isoler les glycoconjugués. Les glycolipides des cellules monocytaires ont été extraits par différentes proportions de chloroforme et méthanol. Les glycolipides, une fois extraits, sont saponifiés en condition basique pendant deux heures, et séparés sur une cartouche de C18 avant perméthylation. L'étape de perméthylation va permettre de remplacer les groupements hydroxyles libres portés par les glycosphingolipides par des groupements méthoxy. Cette dérivation permet de purifier nos composés, mais également d'augmenter leur sensibilité en spectrométrie de masse MALDI-TOF (Figure 31).

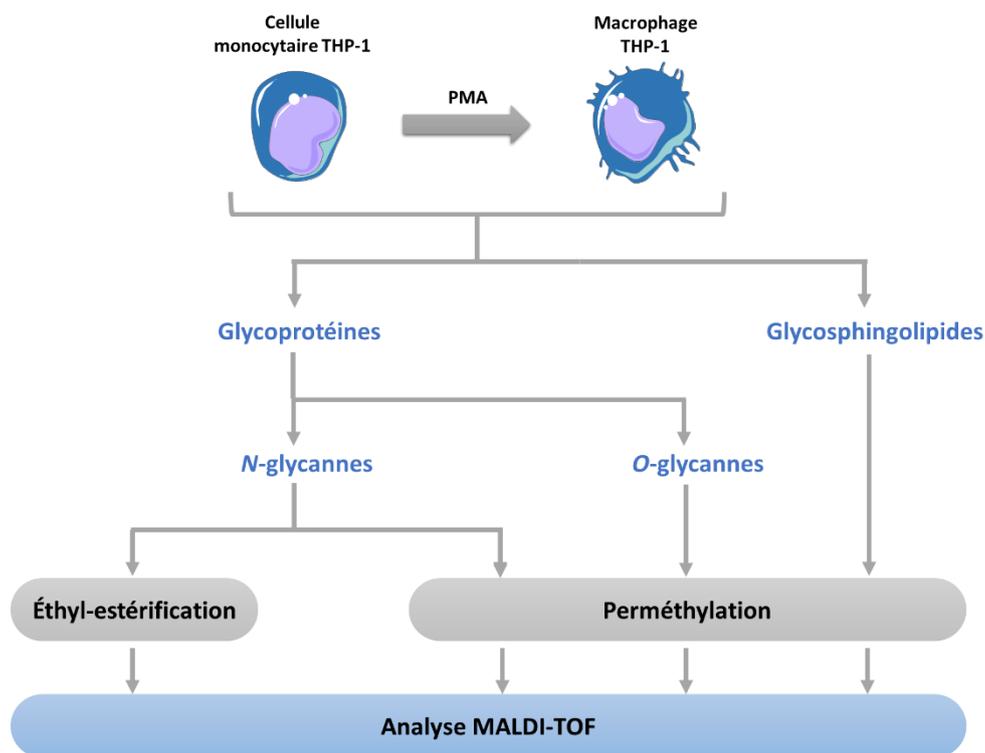


Figure 31 – Stratégie expérimentale utilisée pour comparer la glycosylation des cellules THP-1 indifférenciées et différenciées.

Les glycosphingolipides, les *N*-glycannes et les *O*-glycannes sont extraits et purifiés à partir d'un même échantillon biologique et analysés par spectrométrie de masse sous forme de dérivés perméthylés et éthyl-estérifiés.

Pour l'analyse de la N-glycosylation, plusieurs méthodologies ont été utilisées dans le but d'étudier les variations de glycosylation. La première méthodologie utilisée « classique » est basée sur une dénaturation des glycoprotéines par le DTT (L-Dithiothreitol) et l'IAA (iodoacétamide). Les glycoprotéines sont digérées ensuite par la trypsine avant de libérer les N-glycannes par l'action de la PNGase F, enzyme capable de cliver la liaison glycosidique entre le résidu de GlcNAc en position réductrice et le résidu d'Asn. Les glycannes sont purifiés sur cartouche de C18 avant d'être, comme les GSLs, perméthylés.

En plus de l'étude des N-glycannes perméthylés, nous avons également choisi d'analyser les N-glycannes après un second type de dérivation : l'éthyl-estérification. Les glycoprotéines sont fixées sur une membrane de PVDF sur laquelle elles vont être déglycosylées, et les glycannes libérés vont subir la réaction de dérivation. Ces travaux sur l'éthyl-estérification ont été réalisés dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe du Pr. Manfred Wuhrer, à l'université de Leiden aux Pays-Bas. Lors d'une mission de deux semaines à Leiden, j'ai pu acquérir les compétences nécessaires afin de transposer cette technique dans notre laboratoire. Cette seconde technique d'analyse permet de différencier les résidus d'acides sialiques liés en $\alpha 2,3$ et en $\alpha 2,6$. Pour les acides sialiques liés en $\alpha 2,3$, l'orientation de la liaison permet la formation d'une lactone entre la fonction acide carboxylique et le groupement hydroxyle en position C2 du résidu de galactose précédent. Tandis que pour les acides sialiques en $\alpha 2,6$, il y a formation d'un ester d'éthyl au niveau de la fonction acide carboxylique (Figure 32) (Alley and Novotny, 2010; Reiding *et al.*, 2014; Wheeler *et al.*, 2009).

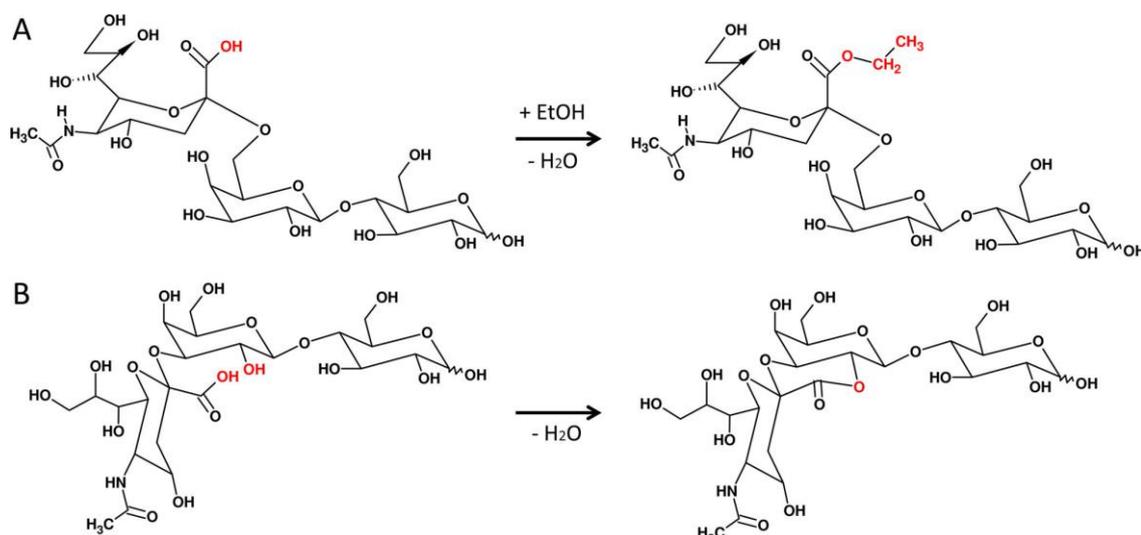


Figure 32 - Mécanisme de la réaction d'éthyl-estérification sur des résidus d'acides sialiques liés en position 3 et en position 6.

Structures du 6'-sialyllactose (A) et du 3'-sialyllactose (B) avant et après la réaction d'éthyl-estérification. Alors que les acides sialiques liés à en α 2,6 portent un ester éthylique au niveau de l'acide carboxylique, les acides sialiques liés en α 2,3 forment une lactone avec le galactose voisin.

C – Analyses en spectrométrie de masse des profils de glycosphingolipides

1 – Des cellules monocytaires THP-1

Les GSLs des cellules THP-1 expriment un profil glycanne pauvre en gangliosides avec quelques traces de GM1 pour l'ion à m/z 1933.1, mais principalement des glycosphingolipides neutres de la série des globosides (Figure 33). Les glycosphingolipides les plus présents sont le LacCer, le Gb3 et un mélange de Gb4 et GA1 déterminé par spectrométrie de masse MALDI-TOF/TOF. Le LacCer est caractérisé par les ions m/z 1010.7 et 1122.8, le Gb3 par les ions m/z 1214.7 et 1326.9 et le mélange Gb4/GA1 par les ions m/z 1459.8 et 1572. Il est intéressant de voir que le précurseur du Gb4, le Gb3 est détecté ; alors que celui de GA1, le GA2 n'apparaît pas sur le spectre de masse.

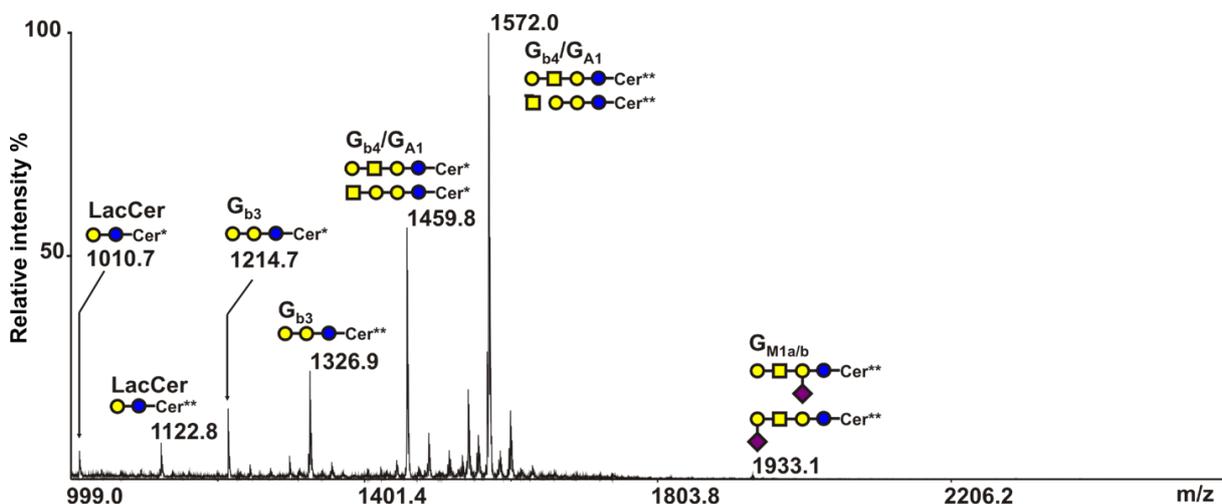


Figure 33 - Spectre de masse MALDI-TOF représentatif des GSLs perméthylés des cellules monocytaires THP-1.

La nature des glycannes a été déterminée par l'analyse MS/MS, comme décrit ci-dessous. (Cer* : d18:1/C16:0 ; Cer** : d18:1/C24:0)

Afin d'établir avec certitude la structure glycanne des glycolipides, les glycannes perméthylés sont analysés par spectrométrie de masse MALDI-TOF/TOF. Cette dernière permet de fragmenter les ions des GSLs observés par spectrométrie de masse MALDI-TOF afin d'obtenir des ions de masse plus petite et d'en déduire les séquences glycanne et la nature

du lipide. Les règles de fragmentation utilisent la nomenclature de Domon et Costello (Figure 34) (Domon and Costello, 1988).

Lors de la fragmentation des glycanes perméthylés, nous obtenons essentiellement des fragments Y/B et Z/C. Les fragments Y/Z portent l'extrémité réductrice tandis que les fragments B/C portent l'extrémité non réductrice de la liaison osidique. Dans le cas des structures comprenant un motif Hex-HexNAc, la perméthylation oriente la fragmentation sur les Y/B devant les HexNAc et en Z/C derrière les HexNAc.

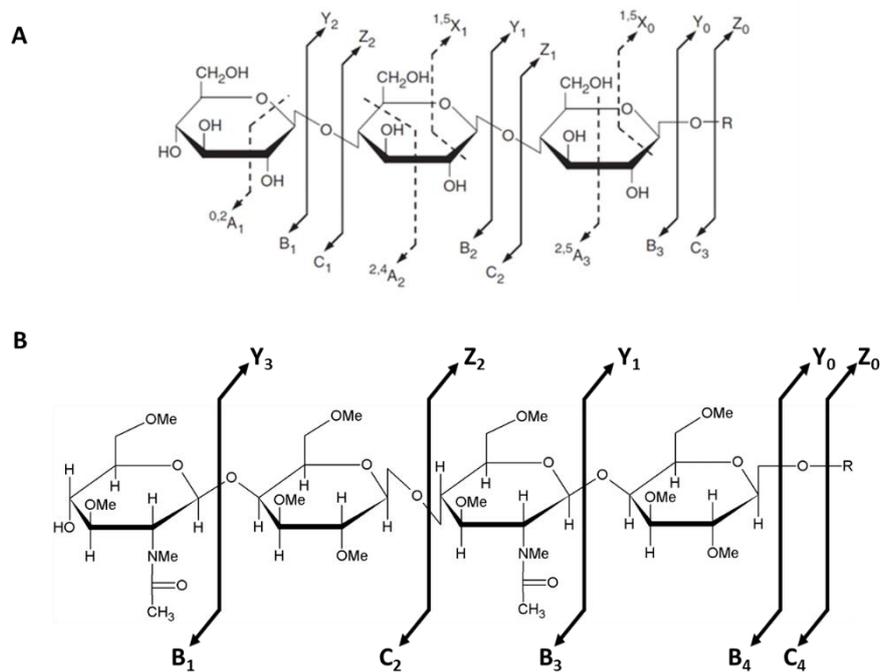


Figure 34 - Fragmentation des glycanes par MS/MS illustrée par la nomenclature de Domon et Costello pour les glycanes natifs (A) ou perméthylés (B)

Les analyses de fragmentation MALDI-TOF/TOF nous indiquent également que la partie lipidique des GSLs est formée majoritairement des céramides de type [d18:1 - C16:0 (Cer*)] et [d18:1 - C24:0 (Cer**)]. Ces types de céramides sont connus pour être majoritairement exprimés au sein des cellules immunitaires (Iwabuchi *et al.*, 2015b). Pour les deux ions parents 1459.8 et 1572.0, la chaîne glycanique est caractérisée par l'apparition de l'ion fils m/z 912.1 (Figure 35).

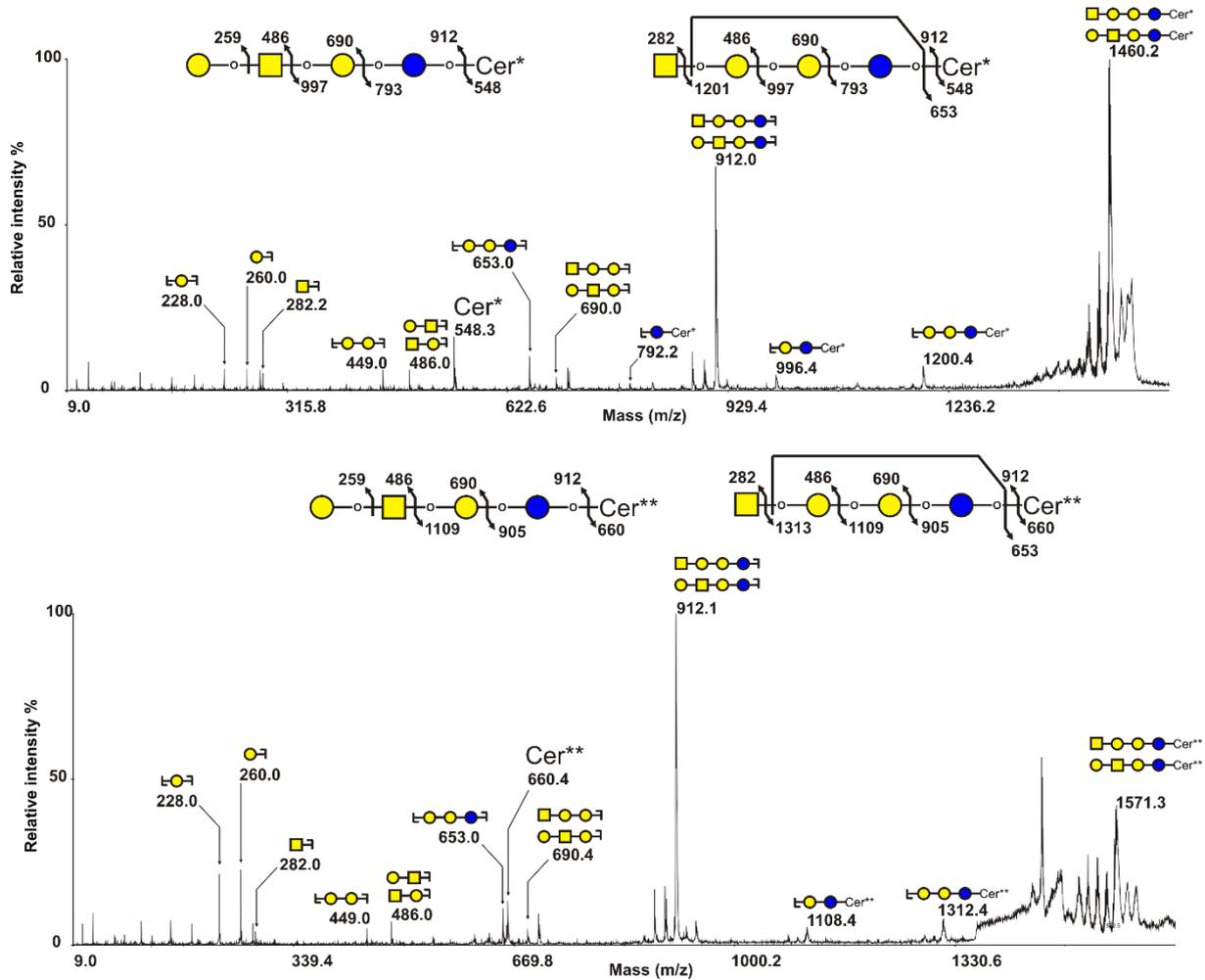


Figure 35 - Analyse MS/MS des GSLs perméthylés Gb4/GA1 des monocytes THP-1

Les spectres MSMS de l'ion m/z 1459.8 (A) et de l'ion m/z 1572.0 (B) correspondent à du Gb4 et du GA1. (Cer* : d18:1/C16:0 ; Cer** : d18:1/C24:0)

Les ions fils m/z 653 et 282 sont caractéristiques du Gb4, alors que l'ion m/z 260 indique qu'il s'agit de GA1. Les ions m/z 548 et 660 sont respectivement les céramides [d18:1/ C16:0 (Cer*)] et [d18:1/ C24:0 (Cer**)]. Pour l'ion parent m/z 1933.1 du GM1, les fragments donnés indiquent la présence d'un mélange de deux isomères du GM1 : le GM1a et le GM1b (Figure 36).

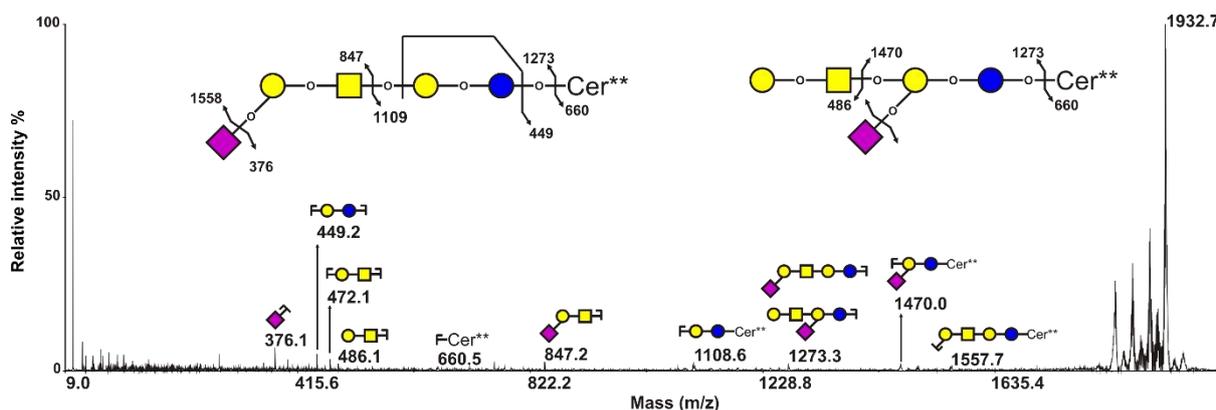


Figure 36 - Analyse MS/MS de l'ion m/z 1933 des GSLs perméthylés GM1a/GM1b des cellules monocytaires THP-1.

Le couple d'ions fils m/z 1109/847 caractérise le GM1b car il s'agit du fragment sialylé sur le résidu de galactose terminal. Le couple m/z 1470/486 est propre au GM1a car l'unité lactosaminique terminale n'est pas sialylée.

2 – Des cellules THP-1 différenciées par le PMA

Après avoir déterminé la composition en GSLs des monocytes THP-1, celle des THP-1 différenciées par PMA a été élucidée. Le profil des THP-1 différenciées présente de nouvelles structures, absentes des profils des monocytes (Figure 37 ; Tableau 5)

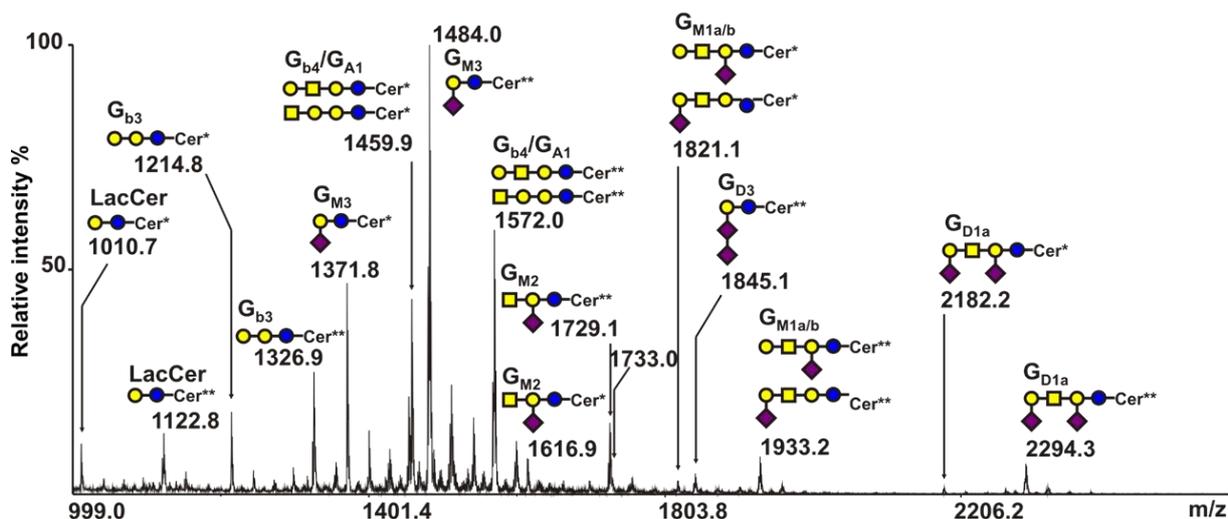


Figure 37 - Spectre de masse MALDI-TOF représentatif des GSLs perméthylés des cellules THP-1 différenciées

La nature des glycanes a été déterminée par l'analyse MS/MS, comme décrit ci-dessous. (Cer* : d18:1/C16:0 ; Cer** : d18:1/C24:0)

Acides Gras	GSLs	Masse moléculaire mono-isotopique			Composition
		Théorique	Non-différenciées	Différenciées	
C16:0	LacCer	1010.8	✓	✓	Hex ₂ -Cer ⁵⁴⁸
C24:0	LacCer	1122.9	✓	✓	Hex ₂ -Cer ⁶⁶⁰
C16:0	G _{b3}	1214.9	✓	✓	Hex ₃ -Cer ⁵⁴⁸
C24:0	G _{b3}	1326.9	✓	✓	Hex ₃ -Cer ⁶⁶⁰
C16:0	G _{M3}	1372.0	X	✓	NeuAc ₁ Hex ₂ -Cer ⁵⁴⁸
C24:0	G _{M3}	1484.0	X	✓	NeuAc ₁ Hex ₂ -Cer ⁶⁶⁰
C16:0	G _{b4} /G _{A1}	1460.0	✓	✓	Hex ₃ HexNAC ₁ -Cer ⁵⁴⁸
C24:0	G _{b4} /G _{A1}	1572.1	✓	✓	Hex ₃ HexNAC ₁ -Cer ⁶⁶⁰
C16:0	G _{M2}	1617.1	X	✓	NeuAc ₁ Hex ₂ HexNAC ₁ -Cer ⁵⁴⁸
C24:0	G _{M2}	1729.2	X	✓	NeuAc ₁ Hex ₂ HexNAC ₁ -Cer ⁶⁶⁰
C16:0	G _{D3}	1733.1	X	✓	NeuAc ₂ Hex ₂ -Cer ⁵⁴⁸
C24:0	G _{D3}	1845.2	X	✓	NeuAc ₂ Hex ₂ -Cer ⁶⁶⁰
C16:0	G _{M1a/b}	1821.2	✓	✓	NeuAc ₁ Hex ₃ HexNAC ₁ -Cer ⁵⁴⁸
C24:0	G _{M1a/b}	1933.3	✓	✓	NeuAc ₁ Hex ₃ HexNAC ₁ -Cer ⁶⁶⁰
C16:0	G _{D1a}	2182.3	X	✓	NeuAc ₂ Hex ₃ HexNAC ₁ -Cer ⁵⁴⁸
C24:0	G _{D1a}	2294.4	X	✓	NeuAc ₂ Hex ₃ HexNAC ₁ -Cer ⁶⁶⁰

Tableau 5 - Affectation des ions moléculaires ([M + Na]⁺) observés dans les spectres MALDI-TOF de glycosphingolipides perméthylés de cellules THP-1 non-différenciées et différenciées par PMA.

✓ : Détecté ; X : Non détecté

La comparaison des profils des GSLs perméthylés des cellules THP-1 non-différenciées et différenciées montre que la différenciation par le PMA conduit à de profondes modifications du profil d'expression des GSLs. Alors que les cellules monocytaires expriment presque uniquement des GSLs neutres de la série des globosides et des asialo-gangliosides, comme le Gb3 (Gal α 1-3/4Gal β 1-4Glc β 1-Cer) et le Gb4 (GalNAc β 1-3/4Gal α 1-3/4Gal β 1-4Glc β 1-Cer), les cellules THP-1-PMA différenciées produisent des taux significativement plus élevés de GSLs de la famille des gangliosides avec un ou deux résidus d'acide sialique. L'augmentation globale en gangliosides est contrebalancée par une baisse du contenu des GSLs neutres. La quantification relative des signaux MS indique que le taux de gangliosides est 40 fois plus important suite à la différenciation des monocytes en macrophages (Figure 38A).

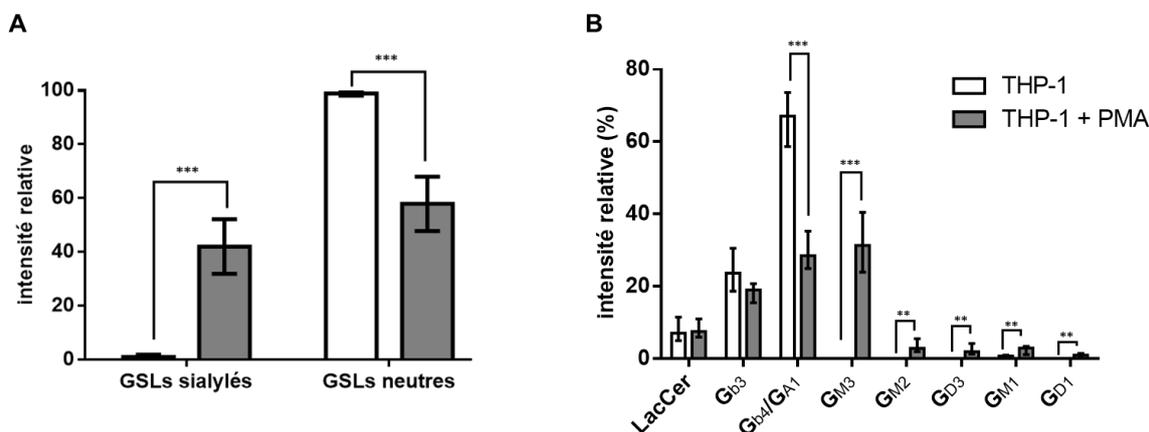


Figure 38 – Composition relative en glycosphingolipides perméthylés isolés à partir de cellules THP-1 non différenciées et différenciées par PMA.

Composition en GSLs neutres et sialylés (A) et de chaque espèce de GSL (B). Les données sont représentatives de six expériences indépendantes. Les moyennes et les écart-types sont calculés à partir d'un test ANOVA effectué sur le logiciel GraphPad Prism 5 (**p<0.01; *p<0.05).

En particulier, une proportion beaucoup plus importante du ganglioside mono-sialylé GM3 est observée dans les cellules traitées au PMA, ainsi qu'une augmentation légère mais significative de GM1. De même, il est observé de manière reproductible que dans les cellules THP-1 différenciées, un signal GM2 à m/z 1616.9 et des signaux de disialo-gangliosides GD1 et GD3 à m/z 1845.1 et 2294.3 qui ne sont pas observés dans les cellules monocytaires (Figure 38B).

Pour ce qui est du GD1, il existe quatre isomères différents : le GD1a, le GD1b, le GD1c et le GD1 α . Comme dans le cas du GM1, la fragmentation par MALDI-TOF/TOF a confirmé la présence unique de GD1a à partir de l'ion moléculaire m/z 2294.3 (Figure 39).

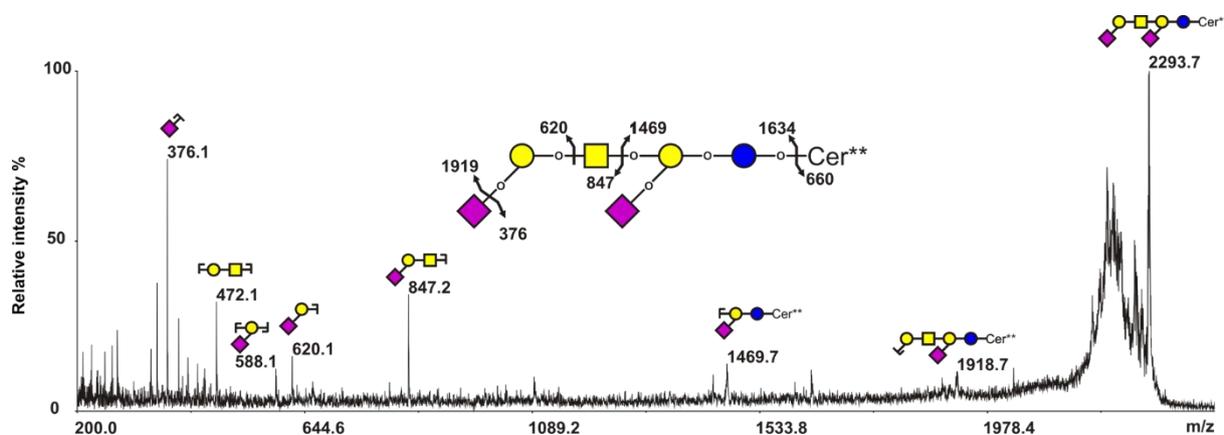


Figure 39 - Analyse MS/MS de l'ion m/z 2294 des GSLs perméthylés GD1a des cellules THP-1 différenciées par le PMA

En effet, la paire d'ions B/Y m/z 847/1469 indique clairement la présence d'un résidu d'acide sialique sur le LacNAc terminal et d'un acide sialique sur le disaccharide interne, caractéristique du GD1a. En revanche, l'absence de la paire d'ions B/Y m/z 1208/1108 propre à un LacNAc terminal di-sialylé, établit l'absence de GD1, ou alors une présence en quantités inférieures au seuil de détection. Pour finir, contrairement à la fraction glycanique, aucune différence n'a été observée dans la composition de sphingosine et d'acide gras de GSL qui montre un rapport constant [d18:1/ C16:0] / [d18:1/C24:0] de 40% et 60% (Figure 40)

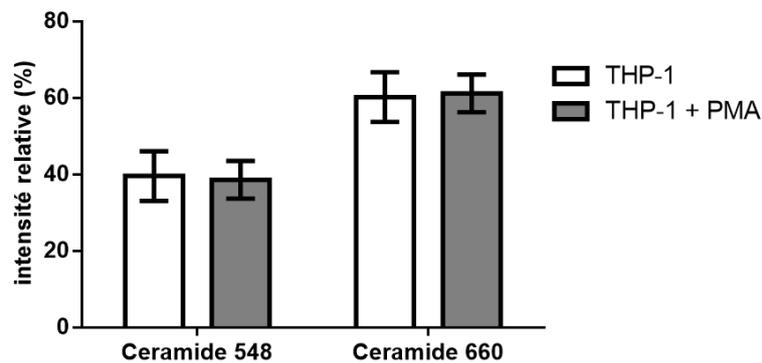


Figure 40 - Composition en céramide de l'ensemble des GSLs isolés à partir de cellules THP-1 non différenciées et différenciées par PMA.

Les données sont représentatives de six expériences indépendantes. Les moyennes et les écart-types sont calculés à partir d'un test ANOVA effectué sur le logiciel GraphPad Prism 5

D – Analyses en spectrométrie de masse des profils de *N*-glycosylation

1 – Des cellules monocytaires THP-1

Après avoir déterminé de manière fine la composition en GSLs des cellules THP-1, la suite des travaux a été de déterminer le *N*-glycome de ces mêmes cellules. Les glycoprotéines extraites à partir de cellules THP-1 ont été dénaturées et déglycosylées de façon enzymatique par la PNGase F.

Les *N*-glycannes libérés perméthylés à partir de cellules THP-1 ont permis l'identification d'un grand nombre de structures en spectrométrie de masse. Comme pour les GSLs, la composition individuelle des *N*-glycannes a d'abord été établie par spectrométrie de masse MALDI-TOF,

puis leurs séquences ont été établies par fragmentation MALDI-TOF/TOF en fonction de la connaissance préalable des processus de *N*-glycosylation humaine.

Les signaux de faible poids moléculaire (m/z 1500-2500) ont été principalement identifiés comme des *N*-glycannes de type oligomannosidique composés de cinq à neuf résidus de mannose (m/z 1579.3, 1783.3, 1987.3, 2191.3 et 2395.4) qui représentent environ 60% des *N*-glycannes totaux des cellules THP-1 non-différenciées. Les signaux restants ont été identifiés comme des *N*-glycannes de type complexe portant différentes modifications comme la sialylation et la fucosylation (Figure 41 ; Tableau 6).

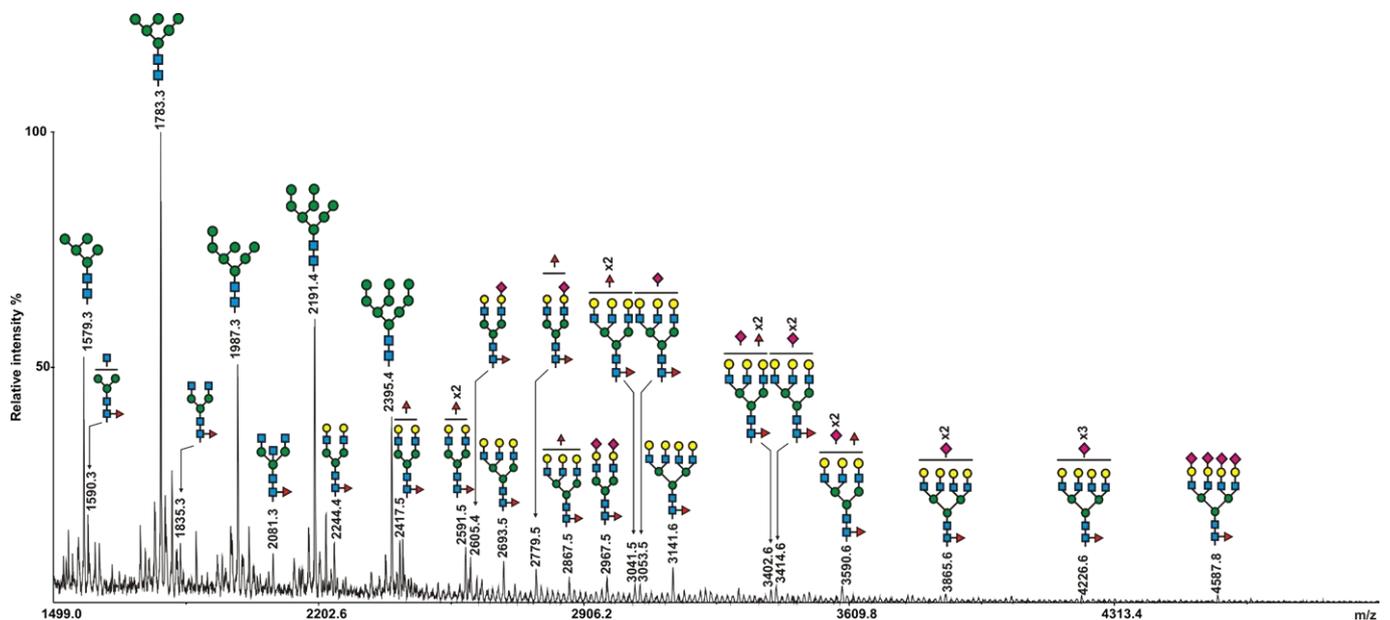


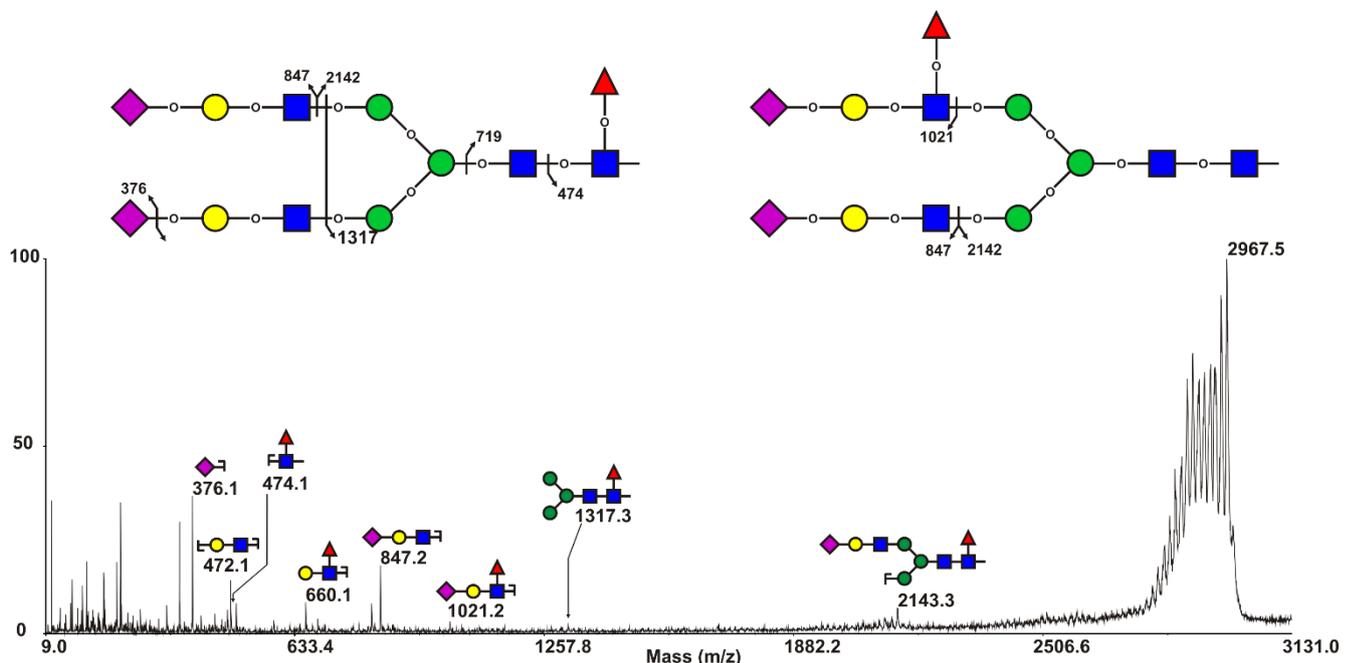
Figure 41 - Spectre de masse MALDI-TOF représentatif des *N*-glycannes perméthylés des cellules THP-1 non différenciées.

Les données extraites des profils de spectrométrie de masse ont révélé que les *N*-glycannes complexes étaient principalement des glycannes bi-antennés ($\approx 70\%$). Le reste des *N*-glycannes complexes est composé d'environ 20% de *N*-glycannes tri-antennés et de 10% tétra-antennés. Les faibles intensités des structures de haute masse n'ont pas permis d'effectuer une analyse MS/MS. Les structures tri- et tétra-antennées annotées peuvent présenter des motifs polyLacNAc. Sur la base des structures relevées, une grande hétérogénéité dans les degrés de sialylation et de fucosylation est observée. Alors que la majorité des *N*-glycannes complexes sont mono-fucosylés, les spectres MS montrent des structures multi-fucosylées telles que NeuAc₁Fuc₂Hex₅HexNAc₄ à m/z 2779.5 (Figure 41).

	Masse moléculaire mono-isotopique théorique perméthylés			Composition
	Théorique	Non-différenciées	Différenciées	
Oligomannosidique	1579.8	11,10%	10,76%	Hex ₅ HexNAC ₂
	1783.9	20,42%	11,18%	Hex ₆ HexNAC ₂
	1988.0	10,52%	7,88%	Hex ₇ HexNAC ₂
	2192.1	11,60%	9,12%	Hex ₈ HexNAC ₂
	2396.2	6,82%	4,38%	Hex ₉ HexNAC ₂
Bi-antennés	1590.8	4,33%	4,71%	Fuc ₁ Hex ₃ HexNAC ₃
	1620.8	2,40%	3,18%	Hex ₄ HexNAC ₃
	1835.9	2,87%	3,46%	Fuc ₁ Hex ₃ HexNAC ₄
	2070.0	0,99%	2,67%	Hex ₄ HexNAC ₅
	2081.1	1,84%	1,43%	Fuc ₁ Hex ₃ HexNAC ₅
	2244.1	2,42%	3,82%	Fuc ₁ Hex ₅ HexNAC ₄
	2418.2	2,74%	2,26%	Fuc ₂ Hex ₅ HexNAC ₄
	2431.2	1,16%	2,79%	NeuAc ₁ Hex ₅ HexNAC ₄
	2592.3	3,06%	1,70%	Fuc ₃ Hex ₅ HexNAC ₄
	2605.3	2,72%	4,06%	NeuAc ₁ Fuc ₁ Hex ₅ HexNAC ₄
	2779.4	2,58%	1,67%	NeuAc ₁ Fuc ₂ Hex ₅ HexNAC ₄
	2792.4	0,79%	1,57%	NeuAc ₂ Hex ₅ HexNAC ₄
	2966.5	1,38%	2,71%	NeuAc ₂ Fuc ₁ Hex ₅ HexNAC ₄
	3140.6	0,16%	0,11%	NeuAc ₂ Fuc ₂ Hex ₅ HexNAC ₄
	3314.7	0,31%	0,49%	NeuAc ₂ Fuc ₃ Hex ₅ HexNAC ₄
Tri-antennés	2519.3	0,72%	1,48%	Hex ₆ HexNAC ₅
	2693.4	1,29%	2,23%	Fuc ₁ Hex ₆ HexNAC ₅
	2880.4	0,55%	1,04%	NeuAc ₁ Hex ₆ HexNAC ₅
	3054.5	0,84%	1,91%	NeuAc ₁ Fuc ₁ Hex ₆ HexNAC ₅
	3241.6	0,44%	1,14%	NeuAc ₂ Hex ₆ HexNAC ₅
	3415.7	0,70%	2,41%	NeuAc ₂ Fuc ₁ Hex ₆ HexNAC ₅
	3589.8	0,89%	1,30%	NeuAc ₂ Fuc ₂ Hex ₆ HexNAC ₅
	3602.8	0,59%	1,15%	NeuAc ₃ Hex ₆ HexNAC ₅
	3776.9	0,45%	1,48%	NeuAc ₃ Fuc ₁ Hex ₆ HexNAC ₅
Tétra-antennés	2968.5	1,10%	1,85%	Hex ₇ HexNAC ₆
	3142.6	0,18%	0,43%	Fuc ₁ Hex ₇ HexNAC ₆
	3329.7	0,54%	0,73%	NeuAc ₁ Hex ₇ HexNAC ₆
	3503.8	0,12%	0,43%	NeuAc ₁ Fuc ₁ Hex ₇ HexNAC ₆
	3690.8	0,38%	0,89%	NeuAc ₂ Hex ₇ HexNAC ₆
	3864.9	0,08%	0,25%	NeuAc ₂ Fuc ₁ Hex ₇ HexNAC ₆
	4052.0	0,40%	0,75%	NeuAc ₃ Hex ₇ HexNAC ₆
	4226.1	0,05%	0,05%	NeuAc ₃ Fuc ₁ Hex ₇ HexNAC ₆
	4413.2	0,45%	0,55%	NeuAc ₄ Hex ₇ HexNAC ₆
	4587.3	1,10%	1,85%	NeuAc ₄ Fuc ₁ Hex ₇ HexNAC ₆

Tableau 6 - Ions moléculaires [M + Na]⁺ observés dans les spectres MALDI-TOF de N-glycannes perméthylés des cellules THP-1 non différenciées

La détection des ions fils m/z 474 et 1021 par fragmentation MALDI-TOF/TOF de *N*-glycannes mono-fucosylés a prouvé que les résidus de fucose peuvent être liés soit au résidu de GlcNAc réducteur du core glycanne, soit au niveau des résidus de GlcNAc des antennes, suggérant ainsi un motif de type Sialyl Lewis (Figure 42). Contrairement à la fucosylation, la sialylation a été observée dans environ 40% des *N*-glycannes complexes perméthylés. Ces derniers sont principalement mono- et di-sialylés, bien que des structures tri- et tétra-sialylées ont également été détectées. En outre, des structures totalement sialylées, sur lesquelles chacun des résidus de galactose est substitué par de l'acide sialique, ont été observées en plus petite quantité que des structures partiellement sialylées.



En parallèle, nous avons utilisé une seconde méthode où les *N*-glycannes extraits ont subi une étape d'éthyl-estérification. Cette réaction de dérivation est spécifique aux résidus d'acides sialiques, et permet de distinguer des acides sialiques liés en position $\alpha 2,3$ ou en position $\alpha 2,6$. Par contre, cela conduit à une interprétation plus difficile des spectres de masse. Par exemple, pour un glycanne perméthylé de type NeuAc₃Hex₆HexNAc₅, la masse correspondante sur le spectre est de m/z 3602.8, alors que pour le même glycanne ethyl-estérifié, on peut retrouver quatre masses différentes sur le spectre de masse.

L'analyse du spectre de masse de *N*-glycannes éthyl-esterifiés de la lignée THP-1, nous montre toujours un taux très important (55%) de *N*-glycannes de type oligomannosidique, et une grande hétérogénéité des *N*-glycannes de type complexe (Figure 43).

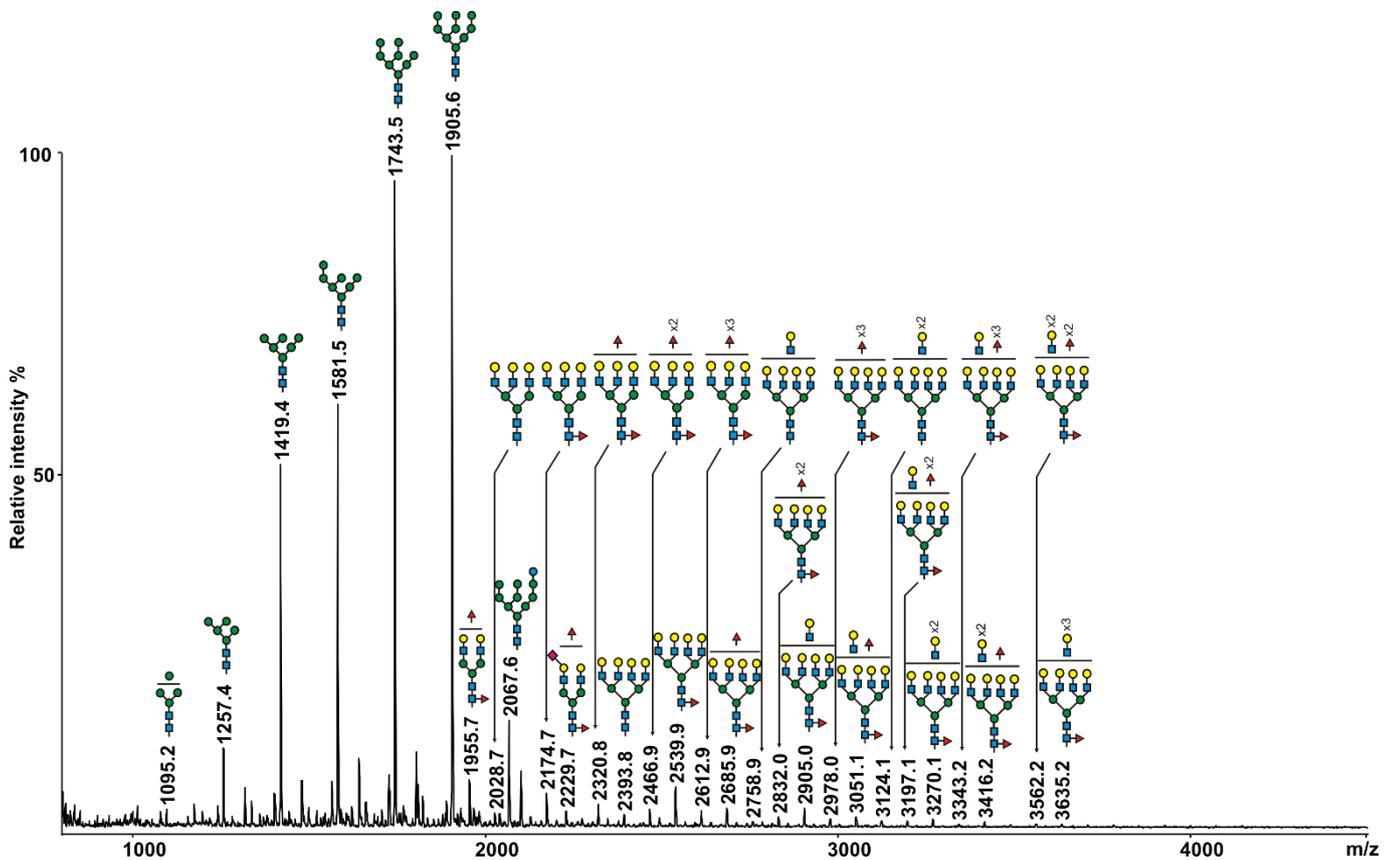


Figure 43- Spectre de masse MALDI-TOF représentatif des *N*-glycannes éthyl-esterifiés des cellules THP-1 non différenciées.

2 – Des Cellules THP-1 différenciées par le PMA

Comme cela a été observé pour les glycolipides, la différenciation des cellules THP-1 par le PMA induit des modifications significatives de la *N*-glycosylation (Figure 45). La proportion de *N*-glycannes perméthylés de type oligomannosidique diminue de 60% à 40%, contrebalancée par une augmentation des structures de type complexe (Figure 44A). Parmi les *N*-glycannes de type complexe, la différenciation des cellules THP-1 en macrophages entraîne une diminution modeste mais significative des *N*-glycannes bi-antennés accompagnée d'une augmentation des structures tri-antennées (Figure 44B). De même, une diminution

significative des structures multi-fucosylées et une augmentation des structures sialylées ont été observées au niveau des profils MS des cellules THP-1 différenciées (Figure 44C et D).

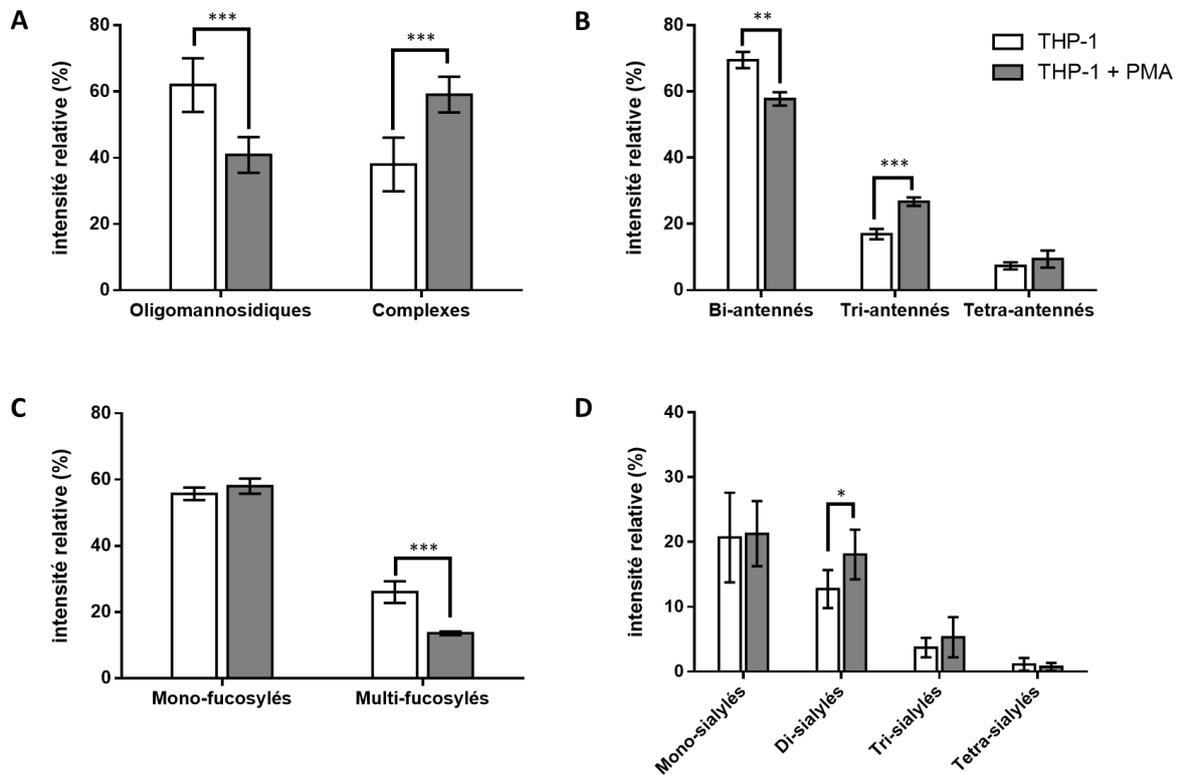


Figure 44 - Modifications structurales des profils MS des *N*-glycannes perméthylés lors de la différenciation des THP-1.

Taux de *N*-glycannes de types oligomannosidique et complexe et à forte teneur en mannose des cellules THP-1 (A); niveaux d'antennarisation des *N*-glycannes complexes (B); taux de fucosylation des *N*-glycannes de type complexe (C) ; taux de sialylation des *N*-glycannes de type complexe (D). Les données sont représentatives de six expériences indépendantes. Les moyennes et les écart-types sont calculés à partir d'un test ANOVA effectué sur le logiciel GraphPad Prism 5 (*** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$).

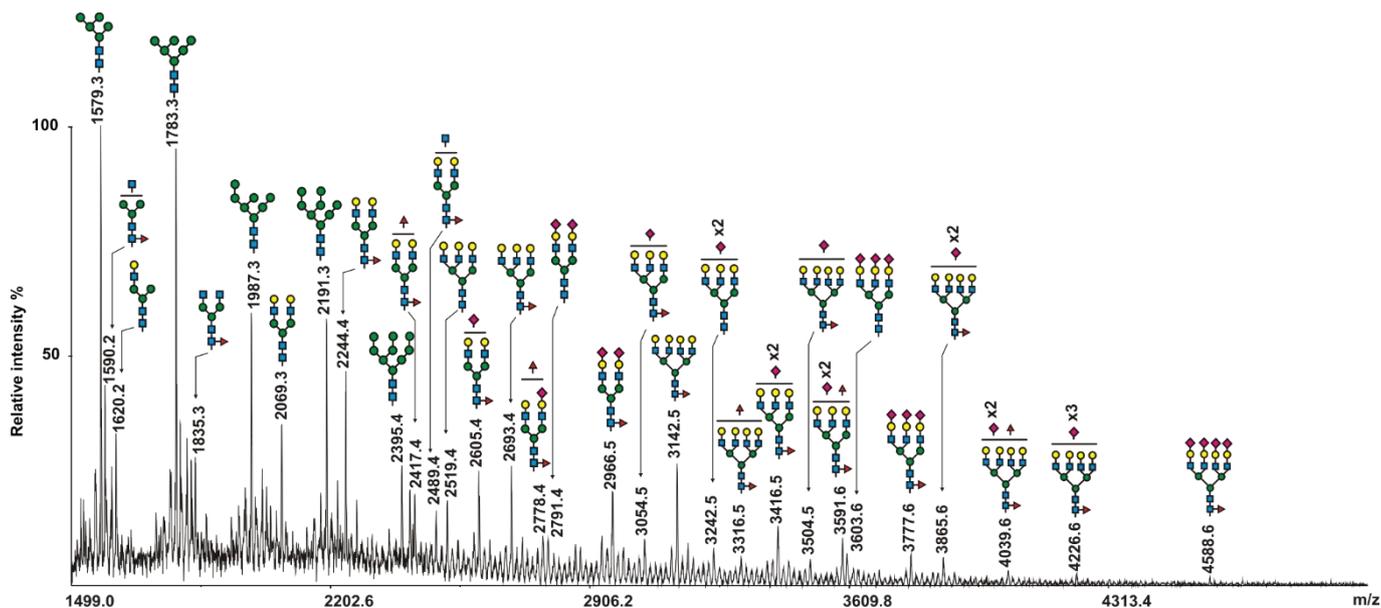


Figure 45 - Spectre de masse MALDI-TOF représentatif des *N*-glycannes perméthylés des cellules THP-1 différenciées

Par exemple, lors de la différenciation, les *N*-glycannes multi-fucosylés $\text{Fuc}_2\text{Hex}_5\text{HexNAc}_4$ (m/z 2779.4), $\text{Fuc}_2\text{Hex}_5\text{HexNAc}_4$ (m/z 2417.5) et $\text{Fuc}_3\text{Hex}_5\text{HexNAc}_4$ (m/z 2591.5) montrent une plus faible intensité après la différenciation THP-1, tandis que les structures bi-antennées non fucosylées comme le $\text{NeuAc}_1\text{Hex}_5\text{HexNAc}_4$ (m/z 2431.4) sont significativement surexprimées. De même, un niveau plus élevé de *N*-glycannes tri-antennés $\text{NeuAc}_2\text{Fuc}_1\text{Hex}_6\text{HexNAc}_5$ (m/z 3416,5) est observé dans les cellules THP-1 macrophagiques par rapport aux cellules indifférenciées.

Afin de comprendre l'origine de la baisse des niveaux de fucosylation des *N*-glycannes, les structures fucosylées sont fragmentées en MS/MS dans le but de déterminer la position du fucose. Les structures mono-fucosylées peuvent présenter le fucose sur le noyau des *N*-glycannes ou bien sur les antennes. L'ion m/z 2967 a été sélectionné pour être fragmenté (Figure 46). Le spectre montre la présence des ions fils m/z 474.1 et m/z 719.2, caractéristique de la fucosylation sur le noyau. L'ion fils m/z 1021, ion qui caractérise le motif Sialyl Lewis, n'est pas détecté sur cette structure glycanique après différenciation. Cependant, en raison de la faible intensité des glycannes, la perte de l'ion m/z 1021 sur les glycannes potentiellement substitués par le motif Sialyl Lewis n'a pas pu être établie sur l'ensemble des *N*-glycannes.

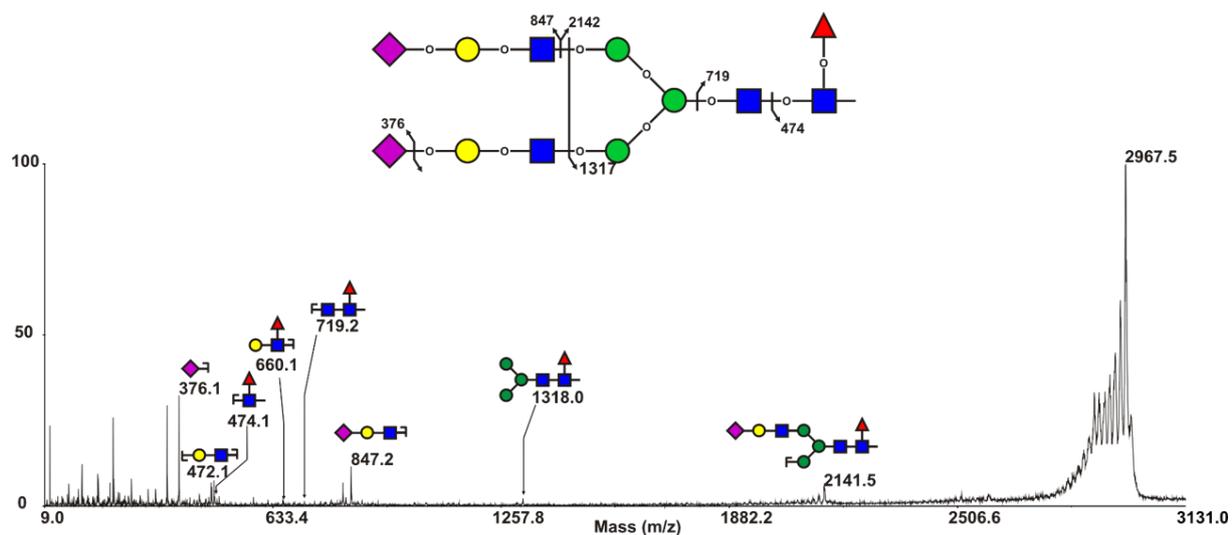


Figure 46 - Analyse MS/MS de l'ion m/z 2967 des *N*-glycannes complexes perméthylés issus des cellules THP-1 différenciées par le PMA

Ensuite, comme pour les cellules non différenciées, les *N*-glycannes des cellules macrophagiques ont été éthyl-estérifiés. Comme le montre le spectre suivant, la différenciation induit des changements des profils de spectres de masse, à l'instar des glycannes perméthylés (Figure 47).

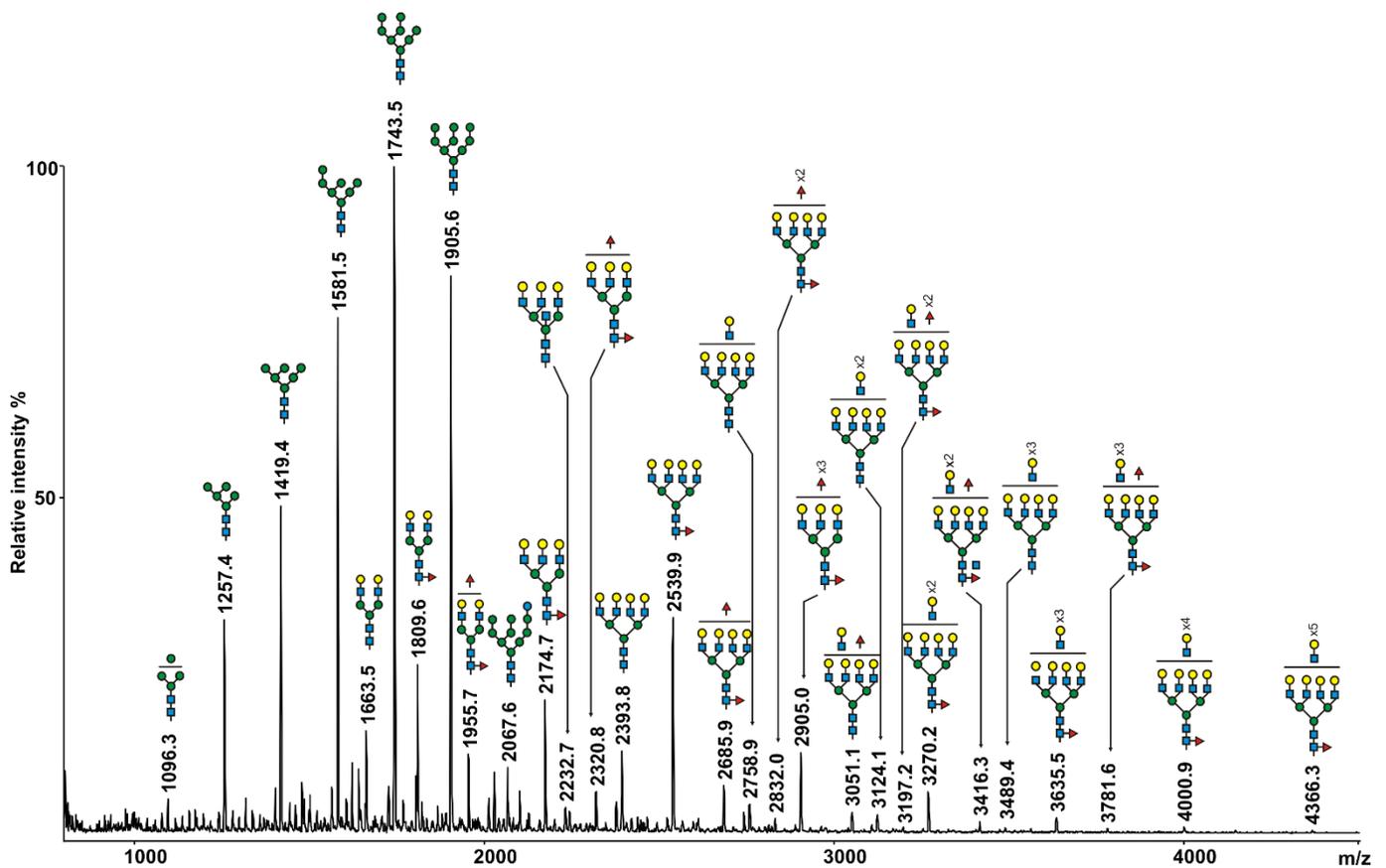


Figure 47- Spectre de masse MALDI-TOF représentatif des *N*-glycannes éthyl-estérifiés des cellules THP-1 différenciées.

Comme il a été décrit précédemment pour les *N*-glycannes perméthylés, les spectres de *N*-glycannes éthyl-estérifiés des cellules différenciées présentent un taux plus important de glycannes de type complexe, et par conséquent un taux plus faible de structures de type oligomannosidique (Figure 48A). Dans l'ensemble, les profils de *N*-glycannes éthyl-estérifiés et perméthylés obtenus présentent des résultats similaires, avec notamment une diminution des structures multi-fucosylées (Figure 48C). Néanmoins, il convient de noter que la proportion de *N*-glycannes sialylés est significativement plus faible sous forme éthyl-estérifiée que sous forme perméthylée (25% contre 38%). Cette différence de taux de sialylation peut s'expliquer par le fait que pour les deux méthodes d'analyses, deux protocoles d'extraction et de dénaturation ont été utilisés, et que la perméthylation confère une meilleure stabilisation des acides sialiques. De plus, après la différenciation induite par le PMA, une diminution légère de la sialylation en $\alpha 2,6$ est observée tandis que la sialylation en $\alpha 2,3$ n'est pas affectée par ce phénomène (Figure 48D).

D'autre part, l'analyse en spectrométrie de masse des *N*-glycannes éthyl-estérifiés a permis de détecter des structures de poids moléculaire plus élevé, et plus particulièrement des *N*-glycannes complexes pouvant porter jusqu'à huit unités LacNAc par rapport à quatre pour les glycannes perméthylés.

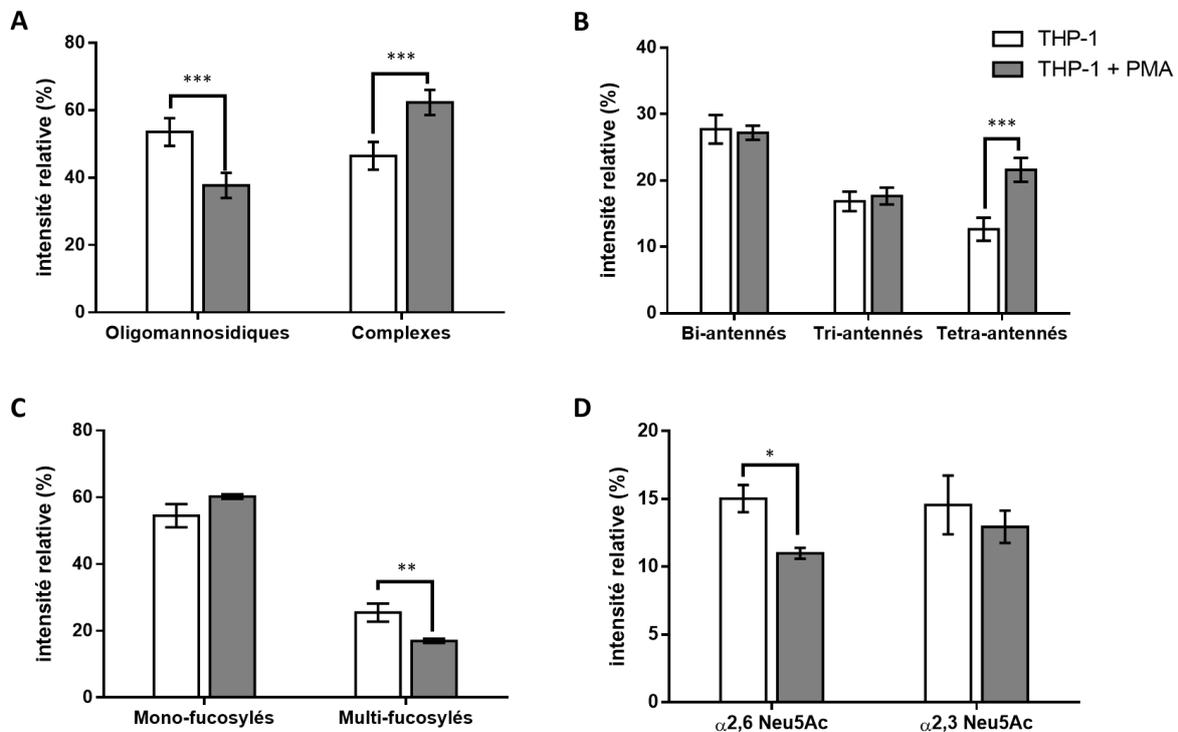


Figure 48 - Modifications structurales des profils MS des *N*-glycannes éthyl-estérifiés lors de la différenciation des THP-1.

Taux de *N*-glycannes de types oligomannosidique et complexes des cellules THP-1 (A); niveaux d'antennarisation des *N*-glycannes complexes (B); taux de fucosylation des *N*-glycannes de type complexe (C) ; niveau de sialylation en α 2,3 et α 2,6 des *N*-glycannes de type complexe (D). Les données sont représentatives de six expériences indépendantes. Les moyennes et les écart-types sont calculés à partir d'un test ANOVA effectué sur le logiciel GraphPad Prism 5 (*** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$).

La détection des ions de haut poids moléculaire indique une tendance à l'augmentation de l'élongation des antennes des *N*-glycannes complexes après différenciation, et principalement les glycannes composés de quatre, cinq et six unités de LacNAc. En effet, l'analyse statistique a révélé que la différenciation induit une augmentation significative des structures Fuc₁Hex₆HexNAc₅ (m/z 2174.7), Hex₇HexNAc₆ (m/z 2393.8), Hex₇HexNAc₆Fuc₁ (m/z 2539.9), Hex₈HexNAc₇Fuc₁ (m/z 2905.0) et Hex₉HexNAc₈Fuc₁ (m/z 2905.0) et Hex₉HexNAc₈Fuc₁ (m/z 3270,2) (Figure 49).

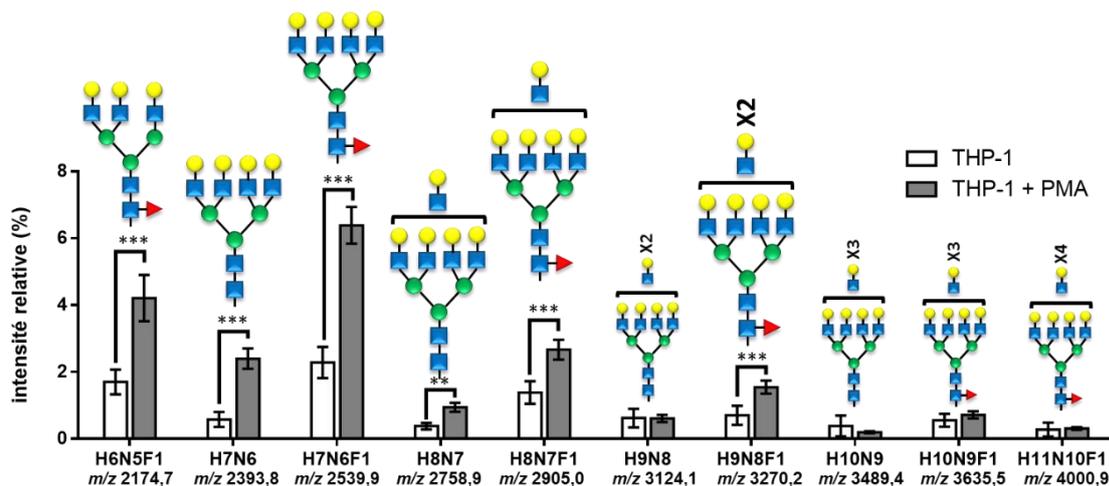


Figure 49 - Quantification relative des *N*-glycannes éthyl-estérifiés de haut poids moléculaire après différenciation.

Les données sont compilées à partir de six expériences indépendantes. Les moyennes et les écart-types sont calculés à partir d'un test ANOVA effectué sur le logiciel GraphPad Prism 5. (***) $p < 0.001$; **) $p < 0.01$; H : Hexose ; N : *N*-acetylhexosamine ; F : Fucose)

La comparaison des profils de *N*-glycannes éthyl-estérifiés à partir de cellules THP-1 indifférenciées et différenciées a confirmé les résultats obtenus à partir de *N*-glycannes perméthylés. La différenciation cellulaire modifie la machinerie de glycosylation, ce qui conduit à la production d'un taux plus important de glycannes de type complexe par rapport au type oligomannosidique. Cette production accrue de *N*-glycannes de type complexe s'accompagne d'une augmentation de l'antennarisation, comme observée avec les *N*-glycannes perméthylés.

E – Analyses en spectrométrie de masses des profils de *O*-glycosylation

Une réaction de bêta-élimination réductrice est effectuée afin de libérer les *O*-glycannes des peptides *N*-déglycosylés générés à partir des cellules THP-1. Après purification sur colonne de Dowex 50x2, les *O*-glycannes sont perméthylés et analysés par spectrométrie de masse MALDI-TOF. L'ensemble des structures identifiées est répertorié dans le tableau et la figure suivants (Figure 50 ; Tableau 7). Les structures annotées sur le spectre suivant n'ont pas été confirmées par MS/MS.

Sur la base du calcul des compositions en monosaccharides en spectrométrie de masse, et de nos connaissances sur la biosynthèse des *O*-glycannes de type mucine dans les cellules

humaines, nous avons identifié des *O*-glycannes avec des noyaux de type 1 (Gal β 1,3GalNAc) et de type 2 (Gal β 1-3[GlcNAc β 1-6]GalNAc).

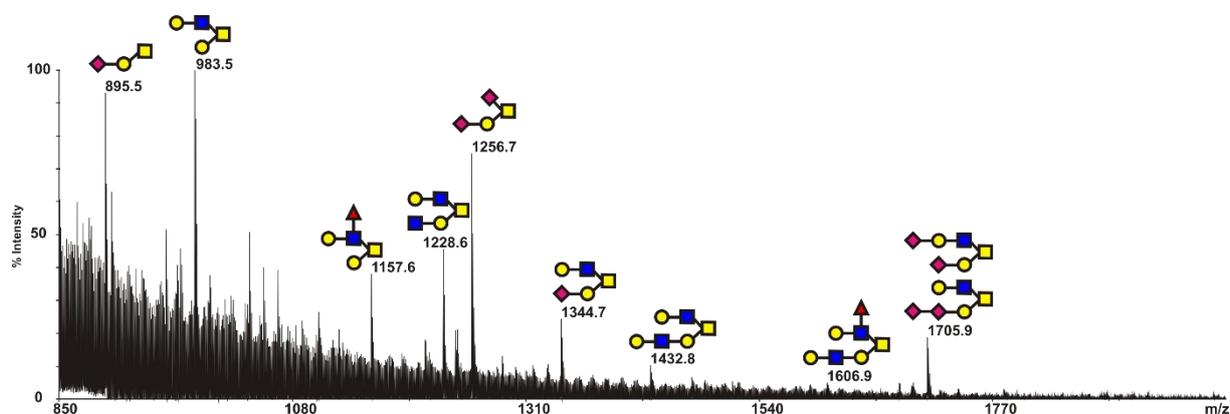


Figure 50 - Spectre de masse MALDI-TOF représentatif des *O*-glycannes perméthylés des cellules THP-1 non différenciées.

Masse moléculaire mono-isotopique			Composition
Théorique	Non-différenciées	Différenciées	
895.5	30,98%	33,23%	NeuAc ₁ Hex ₁ HexNAc-ol
983.5	25,74%	23,89%	Hex ₂ HexNAc ₁ HexNAc-ol
1069.6	10,83%	11,19%	NeuAc ₁ Fuc ₁ Hex ₁ HexNAc-ol
1157.6	9,68%	7,93%	Fuc ₁ Hex ₂ HexNAc ₁ HexNAc-ol
1228.6	3,85%	4,30%	Hex ₂ HexNAc ₂ HexNAc-ol
1256.6	9,03%	11,70%	NeuAc ₂ Hex ₁ HexNAc-ol
1344.7	4,43%	4,09%	NeuAc ₁ Hex ₂ HexNAc ₁ HexNAc-ol
1432.8	1,48%	n.d.	Hex ₃ HexNAc ₂ HexNAc-ol
1606.8	1,18%	0,99%	Fuc ₁ Hex ₃ HexNAc ₂ HexNAc-ol
1705.9	2,81%	2,68%	NeuAc ₂ Hex ₂ HexNAc ₁ HexNAc-ol

Tableau 7 - Affectation des ions moléculaires ([M + Na]⁺) observés dans les spectres MALDI-TOF des *O*-glycannes perméthylés de cellules THP-1 non-différenciées et différenciées par PMA

Les profils MS mettent en avant les signaux m/z 895.4 et m/z 983.4 attribués aux NeuAc₁Hex₁HexNAc-itol et Hex₂HexNAc₁HexNAc-itol. La plupart des *O*-glycannes (55-60%) sont substitués par un ou deux résidus d'acide sialique. En revanche, seulement 25% des *O*-glycannes totaux sont fucosylés et seulement deux *O*-glycannes contiennent à la fois des

résidus d'acide sialique et un résidu de fucose tels que le $\text{Fuc}_1\text{NeuAc}_1\text{Hex}_1\text{HexNAc}$ -itol (m/z 1069.4). L'analyse des données obtenues en spectrométrie de masse MALDI-TOF-MS n'a montré aucune variation significative entre les profils *O*-glycannes des cellules THP-1 non-différenciées et différenciées, ce qui indique que le traitement PMA ne modifie pas le profil général des *O*-glycannes des cellules THP-1 (Tableau 7).

F - Expression de surface des épitopes Lewis X et Sialyl Lewis X des cellules THP-1

L'épitope Lewis X ($\text{Gal}\beta 1-4[\text{Fuc}\alpha 1-3]\text{GlcNAc}\beta 1$) et son homologue sialylé, le Sialyl Lewis X ($\text{NeuAc}\alpha 2-3\text{Gal}\beta 1-4[\text{Fuc}\alpha 1-3]\text{GlcNAc}\beta 1$) font partie des ligands des sélectines les plus fortement exprimés au niveau des glycolipides et des glycoprotéines de la surface cellulaire des cellules immunitaires. Considérant que la différenciation des cellules THP-1 par le PMA affecte la sialylation et la fucosylation de *N*-glycannes complexes, comme l'ont démontré les données MS, nous avons évalué l'expression à la surface cellulaire de Lewis X et Sialyl Lewis X par cytométrie en flux à l'aide d'anticorps spécifiques.

Comme le montre la Figure 51, les fixations spécifiques des anticorps anti-CD15 et anti-sCD15 sur les cellules monocytaires THP-1 démontrent la présence des épitopes Lewis X et Sialyl Lewis X à la surface cellulaire. L'épitope Lewis X est lui aussi détecté à la surface des macrophages THP-1. En revanche, aucune interaction spécifique de l'anticorps anti-sCD15 avec les cellules THP-1 traitées par PMA n'est mesurée, comme en témoigne la superposition avec l'isotype contrôle. Ce résultat révèle que l'expression du Sialyl Lewis X à la surface cellulaire des cellules THP-1 est fortement régulée lors de la différenciation induite par le PMA.

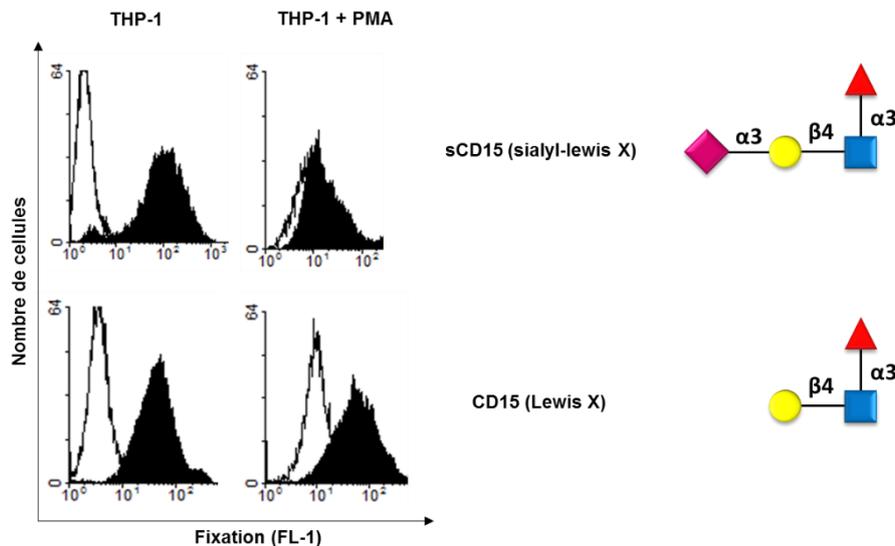


Figure 51 - Détection des épitopes Lewis X et Sialyl Lewis X à la surface cellulaire des cellules THP-1 monocytaires et macrophagiques.

Les cellules sont incubées en présence d'anticorps fluorescents anti-Sialyl Lewis X (sCD15) ou anti-Lewis X (CD15) représentés par les pics noirs. Les pics blancs montrent la fixation non-spécifique d'un isotype contrôle. Les données sont représentatives de trois expériences indépendantes réalisées en duplicate.

G - Analyse par qPCR des niveaux d'expression des gènes de la glycosylation.

Afin de corréler les résultats obtenus par spectrométrie de masse, nous avons par la suite déterminé les niveaux des gènes des voies de biosynthèse de *N*-glycosylation ou des glycosphingolipides potentiellement impliqués. En premier, deux gènes codant pour des enzymes clés de la biosynthèse des gangliosides ont été ciblés : ST3GAL5 encodant la GM3 synthase et B4GALNT1 encodant la GM2/GD2 synthase. Comme le montre la Figure 52, la différenciation des THP-1 induit une expression neuf fois plus importante de la GM3 synthase, ce qui est conforme à l'augmentation observée en spectrométrie de masse de la synthèse de GM3, alors que l'expression de B4GALNT1 n'est pas modifiée dans les cellules différenciées.

En ce qui concerne la biosynthèse des *N*-glycannes, des gènes codant les enzymes responsables de l'antennarisation et de l'allongement des antennes ont été sélectionnés, notamment quatre *N*-acétylglucosaminyltransférases (MGAT1, MGAT2, MGAT4A, MGAT5) et deux β -1,4-galactosyltransferases (B4GALT1; B4GALT3). Le traitement par le PMA induit une expression trois fois plus importante de MGAT1, MGAT5 et B4GALT1 (Figure 52). Ce résultat corréle avec la biosynthèse accrue de *N*-glycannes de type complexe dans des cellules

différenciées, mais également avec une antennarisation plus importante des *N*-glycannes complexes. En revanche, les niveaux d'expression de MGAT2, MGAT4A et B4GALT3 ne sont pas affectés par le traitement au PMA (Figure 52).

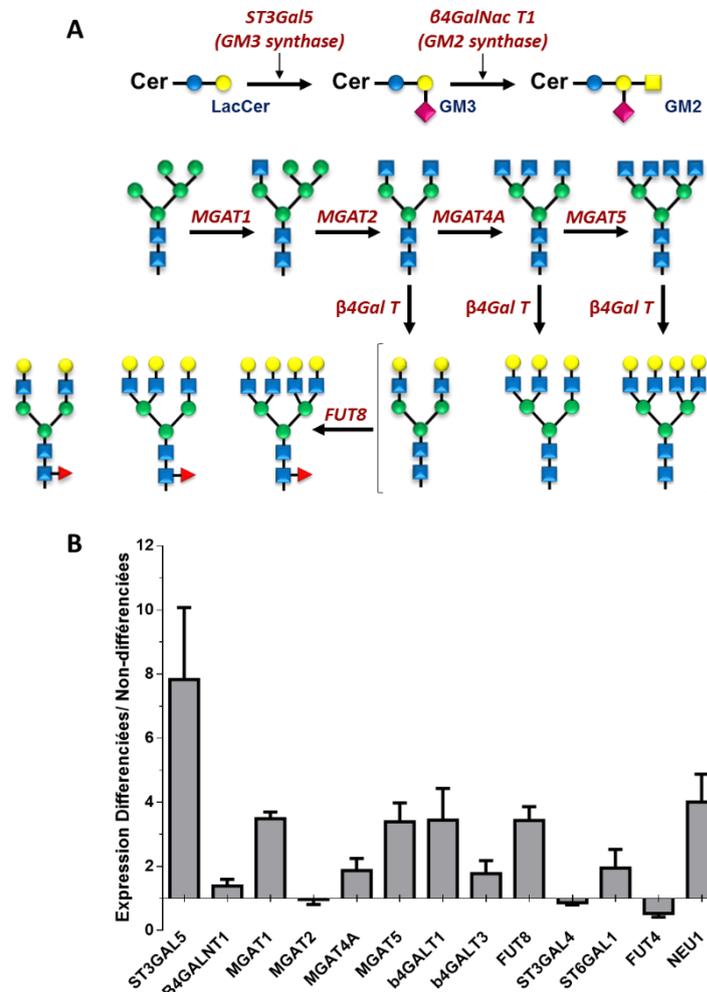


Figure 52 - Représentation schématique du début de la voie de biosynthèse des gangliosides et des *N*-glycannes (A) et expression des ARNm des glycosyltransférases impliquées dans la biosynthèse des *N*-glycannes et des GSLs (B).

Les ARN totaux sont extraits des cellules indifférenciées et des cellules THP-1 différenciées par PMA et les ARNm sont quantifiés par RT-qPCR par la méthode décrite par Pfaffl et normalisée avec le gène HPRT (Pfaffl, 2001). Les données représentent la déviation standard de trois exemplaires à partir de trois expériences indépendantes.

De plus, nous avons étudié l'expression d'un panel d'enzymes impliquées dans la maturation de *N*-glycannes complexes, y compris deux gènes codant les sialyltransférases ST3GAL4 et ST6GAL1 impliquées respectivement dans la α 2,3- et α 2,6-sialylation, deux gènes codant les fucosyltransférases *FUT4* et *FUT8* impliquées respectivement dans la α 1,3- et α 1,6-fucosylation, et la sialidase *NEU1* impliquée dans la dégradation des glycannes sialylés. En ce qui concerne *NEU1*, sa surexpression lors de la différenciation par le PMA a déjà été prouvée

(Liang *et al.*, 2006), et est utilisée ici comme témoin. Comme le montre la Figure 52, *FUT8*, impliquée dans la fucosylation du noyau des *N*-glycannes, est surexprimée d'un facteur trois dans les macrophages par rapport aux monocytes tandis que *FUT4* est sous-exprimée d'un facteur deux. Concernant la sialylation, une augmentation modérée (x1,9) de l'expression de *ST6GAL1* est détectée.

III – Discussion

La lignée cellulaire THP-1 est connue pour être un modèle bien adapté pour étudier les fonctions cellulaires des monocytes/macrophages impliquées dans le système immunitaire inné (Chanput *et al.*, 2014; Park *et al.*, 2007). Les chaînes saccharidiques liées aux glycoprotéines et aux glycolipides sont des ligands à la fois des lectines bactériennes et immunitaires telles que les sélectines, les galectines ou encore les SIGLECs (Chung *et al.*, 2013; Macauley *et al.*, 2014; Mondal *et al.*, 2015). Ces interactions lectine-glycane régulent les processus d'adhésion cellulaire, la différenciation cellulaire, les mécanismes d'apoptose ainsi que les voies de signalisation impliquées dans la production de cytokines et la phagocytose de pathogène (Park *et al.*, 2011). Cette première partie a permis de mettre au point une méthodologie pour l'analyse de la glycosylation des cellules immunitaires et de mettre en évidence les variations du glycome lors de la différenciation de la lignée monocyttaire THP-1 en macrophages, mais également de mettre en lumière la glycosylation totale de ce modèle cellulaire. En combinant différentes approches analytiques telles que l'analyse structurale des glycanes par spectrométrie de masse, la détection d'épitopes glucidiques par cytométrie en flux et la quantification de l'expression de gènes codant pour des glycosyltransférases par qPCR, nous avons montré que la différenciation des cellules THP-1 monocytaires en macrophages conduit à un remodelage des profils de glycosphingolipides et de *N*-glycanes.

Nous avons caractérisé pour la première fois par spectrométrie de masse le profil en glycosphingolipides de cette lignée et établi que la synthèse de nombreux gangliosides (GM3, GM2, GD3, GM1 et GD1) est considérablement augmentée lors de la différenciation de celle-ci. L'augmentation du nombre de structures de type gangliosides après la différenciation des THP-1 est directement corrélée avec la surexpression de l'ARNm de la ST3GAL5 (GM3 synthase). Des études antérieures ont déjà démontré que la différenciation induite par le PMA dans des lignées de cellules leucémiques humaines HL-60 et U937 en macrophages, active la voie PKC ERK ; il s'en suit une régulation de la GM3 synthase, et par conséquent la synthèse de GM3 (Choi *et al.*, 2007; Momoi *et al.*, 1986; Nojiri *et al.*, 1986).

De plus, cette expression élevée de la GM3 synthase n'est pas limitée aux lignées promyélocytaires. Gracheva *et al.* ont reporté un effet similaire lors de la différenciation par le M-CSF des monocytes sanguins humains en macrophages (Gracheva *et al.*, 2009, 2007). Ces

données suggèrent fortement que l'expression de la GM3 synthase est un carrefour métabolique dans la synthèse des gangliosides, lors de la différenciation monocyte/macrophage.

Après les profils de glycosphingolipides, nous avons caractérisé le *N*-glycome des monocytes THP-1 et des macrophages en utilisant deux méthodes différentes lors de la préparation des échantillons. D'une part, les *N*-glycannes ont été libérés à partir de glycopeptides et ensuite per-*O*-méthylés, dans le but d'augmenter la sensibilité de l'analyse en spectrométrie de masse, évitant également une perte des acides sialiques et permettant aussi des informations de séquences déduites à partir de la fragmentation MS/MS (Ionel Ciucanu and Kerek, 1984; Domon and Costello, 1988). En parallèle, nous avons utilisé une deuxième méthode d'analyse pour étudier nos échantillons. Cette méthode est un procédé de préparation d'échantillons à haut débit développé récemment qui consiste à libérer *N*-glycannes à partir de glycoprotéines fixées sur une membrane de PVDF dans une plaque 96 puits, suivie d'une dérivation chimique des glycannes permettant la stabilisation et la discrimination des masses des acides sialiques liés en α 2,3 et α 2,6.

Le but de l'utilisation de deux méthodes n'était pas de comparer les performances (débit, sensibilité, robustesse ...) de chacune, mais plutôt d'obtenir des données complémentaires concernant la structure des *N*-glycannes. Bien que des structures glycaniques similaires soient observées dans les spectres MS de *N*-glycannes perméthylés et éthyl-estérifiés, nous avons constaté des divergences de résultats entre ces deux méthodes. Par exemple, le taux de *N*-glycannes sialylés est significativement plus faible lorsque les *N*-glycannes sont éthyl-estérifiés par rapport aux *N*-glycannes perméthylés (25% contre 38%), alors qu'aucune différence n'est observée concernant les taux de fucosylation (80%). Ce type de différence n'est pas surprenant puisque les deux méthodes de préparation d'échantillons diffèrent en de nombreux points (c'est-à-dire l'extraction / dénaturation de protéines, la libération et la dérivation de glycannes, la purification des glycannes dérivés ...). Néanmoins, malgré ces différences, les deux méthodes ont révélé une augmentation de la proportion de *N*-glycannes de type complexe. En effet, alors que les *N*-glycannes oligomannosidiques sont prédominants dans les cellules THP-1 non-différenciées, comme indiqué dans la base de données du CFG (<http://www.functionalglycomics.org/glycomics/publicdata/glycoprofilng.jsp>) ("Home : Functional Glycomics Gateway,"), les *N*-Glycannes de type complexe représentent le type

majoritaire dans les cellules THP-1 différenciées. Cette augmentation des *N*-glycannes de type complexe est directement corrélée à une surexpression des ARNm d'enzymes jouant un rôle clé dans la régulation de la maturation des *N*-glycannes. En particulier, trois β -*N*-acétylglucosaminyltransférases (MGAT1; MGAT4A; MGAT5), impliquées dans la maturation et la ramification des *N*-glycannes, sont surexprimées de manière significative suite au traitement par le PMA. Contrairement aux cellules THP-1, il a été relevé que dans la lignée monocyttaire HL-60, MGAT1 et MGAT5 sont sous-exprimées après différenciation par le PMA (Liu *et al.*, 1998; Zhao *et al.*, 2003). De la même manière, une augmentation modérée de l'expression de ST6GAL1 est enregistrée suite à la différenciation des cellules THP-1 alors que cette enzyme est réprimée dans HL-60 (Taniguchi *et al.*, 1998). Cet écart peut s'expliquer par une régulation différentielle de l'expression des gènes de glycosyltransférases entre ces deux lignées cellulaires leucémiques, comme décrit précédemment par Gassen *et al.* (Gassen *et al.*, 1998).

De plus, nos résultats montrent une augmentation de l'expression de B4GALT1, une β -1,4-galactosyltransférase impliquée dans la synthèse des épitopes de type 2 polyLacNAc. Cette enzyme pourrait être responsable de l'augmentation des structures de polyLacNAc observées par spectrométrie de masse après différenciation des cellules THP-1. Ces structures polyLacNAc peuvent servir de substrats accepteurs pour différentes modifications comme la sialylation et la fucosylation. Nous avons détecté des *N*-glycannes de type complexe principalement mono-fucosylés et une diminution des structures multi-fucosylées après traitement par le PMA. Ce résultat est conforté par l'augmentation du taux d'ARNm codant *FUT8* et la diminution du niveau d'ARNm de *FUT4*. *FUT8* est une α -1,6-fucosyltransférase responsable de l'addition d'un résidu de fucose sur le premier résidu de GlcNAc du noyau des *N*-glycannes. Par des expériences de cytométrie en flux, Plattner *et al.* ont précédemment observé une fixation accrue de la LCA (*Lens culinaris* agglutinin), une lectine qui reconnaît les *N*-glycannes complexes di- et tri-antennés fucosylés en α 1,6, suite à la différenciation induite par PMA des cellules THP1 (Cummings and Etzler, 2009; Plattner *et al.*, 2009). Cette variation de fucosylation peut influencer la régulation de diverses activités biologiques comme la phagocytose, la présentation et la capture des antigènes ainsi que la polarisation M1/ M2 des macrophages (Li *et al.*, 2014).

Nous avons ensuite observé, comme l'ont fait Stamatou *et al.*, une surexpression de NEU1, une neuraminidase lysosomale migrant à la membrane plasmique lors de la différenciation

des monocytes (Stamatos *et al.*, 2005). Une autre sialidase NEU3, située à la membrane plasmique, a été décrite comme étant régulée à la baisse sur des cellules THP-1 différenciées par le PMA (Liang *et al.*, 2006). Cette surexpression de NEU1 peut être responsable du déclin de la sialylation de l' α 2,6 et de l'épitope Sialyl Lewis X à la surface cellulaire des cellules macrophagiques. Plusieurs études ont prouvé la perte de l'épitope Sialyl Lewis X lors de la différenciation des lignées monocytaires U937 et HL-60 en macrophages (Gadhoum and Sackstein, 2008; Klein *et al.*, 1998; Trabelsi *et al.*, 1997). De plus, Julien *et al.* ont montré que l'expression du Sialyl Lewis X au niveau des *O*-glycannes de PSGL-1 est régulée lors de la différenciation des cellules dendritiques (Julien *et al.*, 2007). Cependant, nous n'avons pu observer aucune variation significative du *O*-glycome lors de la différenciation des cellules THP-1 en macrophages. Cela suggère que la variation de Sialyl-Lewis X sur les THP-1 est contrôlée par la *N*-glycosylation. La sialylation régule l'adhésion cellulaire et le processus d'apoptose des monocytes/macrophages (Liu *et al.*, 2011; Seales *et al.*, 2005; Semel, 2002; Swindall and Bellis, 2011). Le traitement par PMA des monocytes induit une perte de la sialylation de l'intégrine α 5 β 1 via la voie de signalisation PKC/ERK et une adhérence cellulaire accrue à la fibronectine. L'adhésion cellulaire via l'intégrine α 5 β 1 est également régulée par le niveau d'expression de MGAT5, et son activité est impliquée dans l'adhésion et la transmigration des cellules monocytaires THP-1 (Yang *et al.*, 2012). Les activités relatives de ces différentes glycosyltransférases semblent être cruciales pour la différenciation cellulaire.

L'ensemble des résultats présentés dans ce chapitre ont fait l'objet d'une publication parue dans *Journal of Proteome Research* (Delannoy *et al.*, 2016). Cela a permis de mettre en lumière l'ensemble du glycome des cellules THP-1, mais également de mettre en place une méthodologie capable de montrer les variations de glycosylation en spectrométrie de masse. Cette méthodologie peut être ensuite appliquée à l'étude de la glycosylation des macrophages dans des contextes inflammatoires ou infectieux.

Glycosylation changes triggered by the differentiation of monocytic THP-1 cell line into macrophages

Clément P. Delannoy[§], Yoann Rombouts^{§†}, Sophie Groux-Degroote[§], Stephanie Holst[¶], Bernadette Coddeville[§], Anne Harduin-Lepers[§], Manfred Wuhrer[¶], Elisabeth Elass-Rochard^{§}, Yann Guérardel^{§*}*

[§] Univ. Lille, CNRS, UMR 8576 - UGSF - Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, F 59000 Lille, France

[¶] Center for Proteomics and Metabolomics, Leiden University Medical Center, 2300 RC Leiden, The Netherlands

KEYWORDS

Monocyte-to-Macrophage differentiation, glycosphingolipids, glycosylation, mass spectrometry, glycosyltransferases

ABSTRACT

The human acute monocytic leukemia cell line THP-1 is widely used as an *in vitro* phagocytic cell model, since it exhibits several immune properties similar to native monocyte-derived macrophages. In this study, we investigated the alteration of *N*- and *O*- linked glycans as well as glycosphingolipids, during THP-1 differentiation, combining mass spectrometry, flow cytometry and quantitative real-time PCR. Mass spectrometry revealed that macrophage differentiation led to a marked upregulation of expression of GM3 ganglioside as well as an increase of complex-type structures, particularly tri-antennary glycans, occurring at the expense of high-mannose *N*-glycans. Moreover, we observed a slight decrease in the proportion of multi-fucosylated *N*-glycans and α 2,6-sialylation. The uncovered changes in glycosylation correlated with variations of gene expression of relevant glycosyltransferases and glycosidases including sialyltransferases, β -*N*-acetylglucosaminyltransferases, fucosyltransferases and neuraminidase. Furthermore, using flow cytometry and lectin/antibodies directed against glycan structures, we confirmed that the alteration of glycosylation occurs at the cell surface of THP-1 macrophage-like cells. Altogether, we established that macrophagic maturation of THP-1 induces dramatic modifications of the surface glycosylation pattern that may result in differential interaction of monocytic and macrophagic THP-1 with immune or bacterial lectins.

INTRODUCTION

Macrophages and their precursors, monocytes, mediate the innate immune system through the initiation and regulation of inflammation and contribute to the adaptive immunity *via* antigen processing and presentation. The differentiation of monocytes into macrophages or dendritic cells results in phenotypic changes mainly illustrated by the expression of specific cell surface antigens (*e.g.* co-activators markers/adhesion molecules) and the production of either pro- or anti-inflammatory mediators¹. This differentiation process influences the biological functions of these immune cells and leads to a reorganization of cell surface glycans^{2,3}. For example, Bax *et al.* established that the proportion of *N*-acetyl-lactosamine (LacNAc) motifs and sialylated glycans increased during the dendritic cell maturation. Several studies have also reported that these modifications might be related to the modulation of either glycosyltransferases/glycosidases expression and/or their enzymatic activity during the monocytes maturation into macrophages^{4,5}. *N*- and *O*-linked glycans carried by cell surface glycoproteins and glycolipids are involved in different physiological or pathological processes, such as host defense, immunological and inflammatory responses, tissue homeostasis or cancers^{6,7}. In particular, carbohydrates participate to multiple mechanisms of cellular regulation including intracellular trafficking, endocytosis, folding and proteolysis, cell communication, regulation of signaling pathways, as well as cell differentiation, adhesion and growth^{8,9}. Moreover, the structural variability and complexity of glycoproteins/glycolipids allow them to modulate cell-cell recognition through specific interactions with either human or bacterial lectins¹⁰⁻¹². For instance, glycans serve as receptors for a large set of pathogens, including viruses, bacteria, and toxins such as cholera toxin that binds to G_{M1} ganglioside¹³. The relevance of glycosylation in innate and adaptive immunity is well established through the influence of glycans in antigen presentation by MHC followed of T-cell priming, in leucocytes recruitment to inflammatory sites *via* selectins as well as in immune activation and apoptosis process in which a diversity of lectin receptors (mannose receptors, galectins) are involved^{14,15}. Although structural and functional changes in cell surface glycosylation have already been described during the differentiation and activation of several types of immune cells¹⁶, much less is known about the variations of glycosylation that take place during the differentiation of monocytes into macrophages.

Human monocytic cell lines, such as THP-1 or HL-60 are frequently used as macrophage-like models allowing the prediction of both function and behavior of these phagocytes. Indeed, the low cell number and heterogeneity of macrophages obtained from tissue biopsies or

differentiated blood monocytes often represents a barrier to analyze the function of primary cells. Over the last two decades, the human acute monocytic leukemia cell line THP-1¹⁷ has become one of most widely used cell lines to investigate the biological properties and regulation of monocytes/macrophages in immunity, cancer and cardiovascular/atherosclerosis diseases¹⁸⁻²¹. Following treatment with phorbol myristate acetate (PMA), THP-1 cells differentiate into macrophage-like cells that mimic several properties of native monocyte-derived macrophages^{18,21,22}. Indeed, in response to phorbol ester (PMA), THP-1 cells exhibit a high phagocytic and adhesion capacity, a resistance to apoptosis and express surface marker molecules related to primary macrophages. Plattner and coworkers have reported significant changes in the binding of plant lectins to THP-1 cells following PMA-induced differentiation, suggesting an alteration in the cell surface glycosylation pattern²³. And recently, it has been demonstrated that PMA-differentiation disturbed the dynamic of sialylation²⁴. Nevertheless, up to now, no structural studies have further substantiated the exact nature of these changes.

Based on these observations, the aim of this study was to finely analyze the changes of glycosylation that occur during the differentiation of monocytic THP-1 cells into macrophages. Glycolipids as well as *N*- and *O*-linked glycans of glycoproteins were sequentially released and purified from both PMA-treated THP-1 and untreated cells. The glycomic profiles of these cells were analyzed by mass spectrometry and flow cytometry, and the uncovered changes in glycosylation related to THP-1 differentiation were correlated with the expression pattern of glycosyltransferases and glycosidases involved in glycan elongation and trimming.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

Human monocytic THP-1 leukemia cells (ECACC n° 88081201) were seeded at a density of 3×10^5 cells/mL in RPMI-1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated FCS, 2 mM L-glutamine, 20 μ M β -mercaptoethanol and maintained in a humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37°C. Differentiation of THP-1 into macrophage-like cells was achieved by resuspending THP-1 cells at $4,5 \times 10^5$ cells/mL in growth medium supplemented with 20 nM phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) for 72 h^{20–22,25}. PMA treatment induced the adhesion of macrophage-like THP-1 cells to plastic whereas undifferentiated monocytic cells grow in suspension. Cell viability was assessed using trypan blue dye exclusion or flow cytometry (FACSCalibur flow cytometer) by using propidium iodide.

Flow cytometry analysis of cell surface marker

The phenotypic differentiation of THP-1 into macrophage-like cells was controlled by flow cytometry analysis of the cell surface adhesion molecule CD11c expression level in untreated and PMA-treated THP-1 cells^{21,22,26}. Adherent PMA-treated cells were detached from plates with cell dissociation non-enzymatic solution (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) followed by three washes with PBS. Cell surface staining was performed by a direct immunofluorescent assay using FITC-conjugated anti-CD11c mouse IgG1 κ , (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France). Briefly, 250,000 cells were pre-incubated 20 min at 4°C with Fc-receptor blocking reagent (Innovex Biosciences, Richmond, CA, USA) to decrease the non-specific binding, washed with PBS and incubated for 40 min at 4°C with 7 μ l of FITC-conjugated anti-CD11c in PBS containing 0.1% BSA. FITC-conjugated mouse isotype control IgG (BD Biosciences) was used as negative control. The expression of Lewis^x (Le^x) and sialyl-Le^x (sLe^x) epitopes was determined during THP-1 differentiation by flow cytometry using BB515 mouse anti-human CD15 mAb (BD Biosciences) directed against Le^x, and Alexa Fluor 488-conjugated anti-human sCD15 mouse mAb (BD Biosciences) specific for the sLe^x. A control of the non-specific binding was performed in presence of either Alexa Fluor 488 or BB515 mouse IgM κ isotype irrelevant Abs.

Data were monitored on a flow cytometer (FACSCalibur, BD Biosciences) and analyzed with the CellQuest software (Mountain View, CA, USA). Cells were gated for forward- and

side-angle light scatters and the fluorescence channels were set on a logarithmic scale and the mean fluorescence intensity was determined.

Quantitative Real-Time-PCR (qPCR) analysis of glycosylation enzymes

Total RNA was extracted from both undifferentiated THP-1 and PMA-treated cells (3×10^6), using the Nucleospin RNA II kit (Macherey-Nagel, Hoerdt, France), according to the manufacturer's instructions. RNA concentrations were determined using a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, USA). Total RNA was then subjected to reverse transcription as described in The Maxima[®] First Strand cDNA Synthesis Kit. The oligonucleotide sequences (Eurogentec, Seraing, Belgium) used as primers for the PCR reactions are given in Table I.

Primer pairs were either previously described or designed using the primer3 software (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>). QPCR and subsequent data analysis were performed using the Mx3005p Quantitative System (Stratagene, La Jolla, CA, USA). PCR reaction (25 μ L) contained 12.5 μ L of the 2x Brilliant SYBR Green qPCR Mastermix (Thermo Fischer Scientific, Rockford, USA), 300 nM of primers and 4 μ L of cDNA (1:40). DNA amplification was performed with the following thermal cycling profile: initial denaturation at 94°C for 10 min, 40 cycles of amplification (denaturation at 94°C for 30 s, annealing at T_m for 30 s, and extension at 72°C for 30 s) and a final extension at 72°C for 5 min. T_m was 60°C for all PCR reactions except for *HPRT*: 58°C. The fluorescence monitoring occurred at the end of each cycle. The analysis of amplification was performed using the Mx3005p software. For each primer pair, the specificity of the amplification was checked by recording the dissociation curves, visualizing the amplified products in agarose-gel electrophoresis and sequencing the products. The efficiency of amplification was checked by serial dilutions of cDNA from THP-1 cells and was between 95% and 105%. Hypoxanthine-guanine PhosphoRibosylTransferase (*HPRT*) gene was used to normalize the expression of genes of interest. All experiments were performed using three different biological samples. The quantification was performed by the method described by Pfaffl²⁷.

Extraction and purification of glycolipids

Untreated and PMA-differentiated THP-1 cells were detached from T175 flasks with cell dissociation non-enzymatic solution and washed twice with PBS. Cells (2×10^7) were lyophilized and extracted three times with $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (2:1, v/v) and once by $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (1:2, v/v) using intermediary centrifugations at 2500 g for 20 min. Combined supernatants were

dried under a nitrogen stream, subjected to mild saponification in 0.1 M NaOH in CHCl₃/CH₃OH (1:1, v/v) at 37°C for 2 h and evaporated to dryness. Samples were reconstituted in CH₃OH/0.1% TFA in water (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/0.1% TFA in water (1:1, v/v), GSL were eluted by CH₃OH, CHCl₃/CH₃OH (1:1, v/v) and CHCl₃/CH₃OH (2:1, v/v). The elution fraction was dried under nitrogen stream prior to structural analysis.

Sequential release and purification of *N*- and *O*-glycans

Cells were resuspended in 6 M guanidinium chloride and 5 mM EDTA in 0.1 M Tris/HCl, pH 8.4, and agitated for 4 h at 4 °C. Then, dithiothreitol were added to a final concentration of 20 mM and incubated during 5 h at 37°C, followed by addition of 50 mM iodoacetamide overnight in the dark at room temperature. The reduced/alkylated glycoproteins were dialyzed against water at 4°C for 72 h and lyophilized. Samples were incubated with trypsin TPCK (Sigma-Aldrich) at a 20:1 ratio (*w/w*) in 50 mM NH₄HCO₃, pH 8.5, for 24 h at 37°C. The digestion was stopped by incubation at 100°C for 5 min, followed by C₁₈ Sep-Pak chromatography (Waters Corp., Guyancourt, France). C₁₈ Sep-Pak was equilibrated in 5% aqueous acetic acid and washed in the same solvent. Sample was loaded on the C₁₈ Sep-Pak and the bound peptides were eluted with 20%, 40% and 60% (*v/v*) propanol in 5% aqueous acetic acid, pooled and lyophilized. *N*-glycans were released by 10 U *N*-glycosidase F (Roche) digestion in 50 mM NH₄HCO₃ buffer pH 8.4, overnight at 37°C. *N*-glycans and *O*-glycopeptides were separated by C₁₈ Sep-Pak, following the same protocol described above. Propanol fractions, containing *O*-glycopeptides, were pooled and freeze-dried. To liberate *O*-glycans, peptides were submitted to reductive elimination in 1 M NaBH₄ and 0.1 M NaOH at 37°C for 72 h. The reaction was stopped by the addition of Dowex 50×8 cation-exchange resin (25–50 mesh, H⁺ form) until pH 6.5 was reached. After evaporation to dryness, boric acid was distilled 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.

In addition, *N*-glycans were released from cells glycoproteins using a PVDF-membrane based protocol, as previously described²⁸. Shortly, denaturated cells (in 5.8 M GuHCl and 5 mM DTT), were loaded onto preconditioned HTS 96-well plates with hydrophobic Immobilon-P PVDF membrane and incubated for 30 min at 60 °C. Plates were shaken for 5 min on a horizontal shaker prior to centrifugation (1 min, 500 g). The wells were washed twice with 200 μL mQ water prior to centrifugation and once with 200 μL 100 mM NaHCO₃ (1 min, 500 g).

N-glycans were released by overnight incubation at 37°C with 1 mU PNGase F (Roche) in 50 µl of 100 mM NaHCO₃. Glycans were recovered into 96-well collection plates by centrifugation (2 min, 1000 g). *N*-glycans were ethyl-esterified as described by Reiding *et al.*²⁹ by adding 0.25 M HOBt and 0.25 M EDC in ethanol and incubated for 1 h at 37°C. Finally, ACN was added and samples were stored at -20°C for 30 minutes. Samples were purified by cotton HILIC SPE with elution in water and spotted with another matrix solution (10 mg/mL in CH₃CN/H₂O (1:1, v/v)).

Mass spectrometry analysis of glycans

Glycans and glycolipids were permethylated according to the method of Ciucanu and Kerek³⁰ prior to mass spectrometry analysis. Briefly, samples were incubated with DMSO/NaOH/ICH₃ during 2 h under sonication. The reaction was stopped with water and the permethylated glycans were extracted in CHCl₃ and washed at least seven times with water. Permethylated and ethyl-esterified glycans were solubilized in CHCl₃ or water and mixed with 2,5-dihydroxybenzoic acid matrix solution (10 mg/mL dissolved in CHCl₃/CH₃OH (1:1, v/v)) and spotted on MALDI plate. MALDI-TOF mass spectra were acquired on Voyager Elite DE-STR mass spectrometer (Perspective Biosystems, Framingham, MA, USA) and MALDI-TOF/TOF analyzed on 4800 Proteomics Analyzer mass spectrometer (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA) 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%. For each spectrum, 5000 laser shots were performed and accumulated.

RESULTS

Differentiation of monocytic THP-1 cells into macrophage-like cells

Following PMA-induced differentiation of monocytic THP-1 cells into macrophages, cells acquired both adherent properties and phenotypic morphology similar to macrophages (not shown) as previously reported²⁵. The differentiation of THP-1 into macrophages was confirmed by analyzing CD11c integrin expression by flow cytometry²⁶. As shown in Figure 1, CD11c was not detected on the cell surface of untreated THP-1. In contrast, a high expression level of CD11c was observed on PMA-treated THP-1 cells, thereby confirming the differentiation of monocytes into macrophage-like cells. To characterize the changes of glycosylation resulting from the PMA-induced differentiation of THP-1 cells into macrophage-like cells, we first performed a mass spectrometry analysis of cell glycoconjugates including glycosphingolipids and *N*- and *O*-glycans released from glycoproteins. To achieve that, we separated glycosphingolipids and glycoproteins from the same pools of cells by organic partitioning. Glycosphingolipids were further purified by reverse phase chromatography after mild saponification before analysis. In parallel, *N*-glycans and *O*-glycans were sequentially released from glycoproteins, purified and analyzed.

Mass spectrometry analysis of glycosphingolipids

Glycosphingolipids (GSL) are the most diverse and abundant type of cell surface glycolipids. They are involved in essential cellular mechanisms such as the proliferation and differentiation of various cell types. In order to compare their structures in non-differentiated and PMA-differentiated THP-1 cells, GSL were extracted from pellets of 2×10^6 cells. The extracted GSLs were then saponified and purified by solid phase extraction (SPE) on C_{18} cartridge and permethylated, in order to achieve a higher purity and increase of the sensitivity during the MALDI-TOF mass spectrometry measurement (Fig. 2). The nature of all GSLs was first tentatively established based on the calculated composition of glycan and ceramide moieties and the prior knowledge of biosynthetic pathways of human GSLs (Table II). In order to distinguish between isomeric molecules, especially (iso)globo-series from asialo-ganglio-series, we established their sequences by MALDI-TOF/TOF MS/MS fragmentation. Based on these data, the structures of GSLs were inferred³¹. MALDI-TOF/TOF analysis allowed us to determine that signals at m/z 1459.8 and 1572.0 were both mixtures of G_{b4} and G_{A1} substituted by either palmitic acid $C_{16:0}$ (Cer*) or lignoceric acid $C_{24:0}$ (Cer**) (Fig. S-1). MS/MS

analysis of these signals showed that they contained a similar glycan moiety at m/z 912 but different ceramide at m/z 548 and 660. Similarly, we established that the signals at m/z 1821.0 and 1933.1 corresponded to a mixture of two G_{M1} isomers, G_{M1a} and G_{M1b} that differ by the position of the NeuAc residue either on the Gal residue in antepenultimate position or on the Gal residue in terminal position (data not shown). As G_{M1a} and G_{M1b} are precursors of the two G_{D1} isomers namely G_{D1a} and G_{D1c} , we were wondering whether these structures could be identified. Similar to G_{M1} , MALDI-TOF/TOF fragmentation analysis of the signal at m/z 2294.3 confirmed the presence of G_{D1a} but the absence of G_{D1c} (Fig. S-2). Indeed, the observation of the B/Y ion pair at m/z 847/1469 clearly established the presence of one NeuAc on terminal LacNAc and one NeuAc on internal Lac disaccharide as in G_{D1a} . By contrast, the absence of B/Y ion pair at m/z 1208 and 1108 that typifies a di-sialylated terminal LacNAc motif, established that G_{D1c} was absent or present in quantities below the detection limit.

The comparison of MS profiles of permethylated GSLs from undifferentiated and differentiated THP-1 cells showed that PMA-induced cell differentiation leads to profound modifications of the GSLs expression pattern (Fig. 2A). Whereas undifferentiated cells mainly expressed neutral GSLs from (iso)globo-series, such as (iso) G_{b3} ($\text{Gal}\alpha 1-3/4\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}\beta 1\text{-Cer}$) and G_{b4} ($\text{GalNAc}\beta 1-3/4\text{Gal}\alpha 1-3/4\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}\beta 1\text{-Cer}$), PMA-differentiated THP-1 cells produced significantly higher levels of GSLs from ganglio-series with one or more sialic acid residues. Especially, a sharp increase of monosialylated ganglioside G_{M3} was observed in PMA-treated cells (Fig. 2B) as well as a modest but significant increase of G_{M1} . Likewise, we reproducibly observed in differentiated THP-1 cells a G_{M2} signal at m/z 1616.9 and disialogangliosides G_{D1} and G_{D3} signals at m/z 1845.1 and 2294.3 that were never observed in undifferentiated cells. The overall increase in gangliosides content is counterbalanced by a drop in the neutral GSLs content. Relative quantification of the MS signals indicated an overall 40-fold increase of gangliosides proportions following PMA treatment (Fig. 2B). In contrast to the glycan moiety, no difference was observed in the sphingosine and fatty acid composition of GSL that shows a constant Cer*/Cer** ratio of 40/60 (data not shown).

Mass spectrometry analysis of *N*-Glycans

Glycoproteins from THP-1 cells were denatured and digested by PNGase F to release *N*-glycans. In order to obtain as much structural information as possible, we analyzed each sample in both permethylated and ethyl esterified forms. Indeed, permethylation is a well-established method to stabilize sialic acid bond that is otherwise prone to cleavage upon laser irradiation

and renders the oligosaccharides resistant to in-source fragmentation. Furthermore, permethylation was shown to enable an increased reproducibility for glycan relative quantification over native glycans^{32,33}. However, it is conceivable that the drastic derivatization procedure may induce structural rearrangements, which is why we confirmed all the data by an additional mass spectrometry method.

Permethylated *N*-glycans released from undifferentiated THP-1 cells led to the identification of a large number of structures (Fig. 3A and Table III). As for glycolipids, the composition of individual *N*-glycans was first established by MS, and then their sequence established by MS/MS fragmentation based on prior knowledge of human *N*-glycosylation processes. Low mass range signals (1500 to 2500 *m/z*) were mainly identified as high-mannose *N*-glycans composed of five to nine mannose residues (*m/z* at 1579.3, 1783.3, 1987.3, 2191.3 and 2395.4) that represented 60% of the total *N*-glycans in undifferentiated THP-1. The remaining signals were identified as complex-type *N*-glycans that carry different modifications such as sialylation, branching and core and/or terminal fucosylation. Data extracted from mass spectrometry profiling revealed that complex *N*-glycans were mainly bi-antennary glycans (~70%). The remaining profile was composed of 20% of tri-antennary and 10% tetra-antennary *N*-glycans. Based on the calculated b, we observed a high heterogeneity in sialylation and fucosylation. While the majority of complex *N*-glycans were mono-fucosylated, MS spectra showed multi-fucosylated structures such as NeuAc₁Fuc₂Hex₅HexNAc₄ at *m/z* 2779.5 (Fig. 3A). The detection of the fragment ions at *m/z* 474 and 1021 by MALDI-TOF/TOF-MS/MS fragmentation of individual fucosylated *N*-glycans proved that the fucose residues could be attached to the reducing GlcNAc residue of the *N*-glycan core as well as to the antennae GlcNAc residue suggesting a sialyl lewis (sLe) motif (Fig. S-3). In contrast to fucosylation, sialylation was observed in about 40% of permethylated complex *N*-glycans. The latter were predominantly mono- and di-sialylated although tri- and tetrasialylated were also detected. Moreover, fully sialylated structures, with each galactose residues substituted by sialic acid, were less observed than partially sialylated structures.

As observed for glycolipids, differentiation of THP-1 cells with PMA induced significant modifications in the *N*-glycosylation pattern (Fig. 3B). The proportion of high-mannose *N*-glycans decreased from 60% to 40%, balanced by an increase of complex-type structures (Fig. 4A). Among complex-type *N*-glycans, THP-1 differentiation led to a modest but statistically significant decrease of bi-antennary *N*-glycans together with the increase of tri-antennary structures (Fig. 4B). For instance, while the NeuAc₁Fuc₂Hex₅HexNAc₄ (*m/z* at 2779.4),

Fuc₂Hex₅HexNAc₄ (*m/z* at 2417.5) and Fuc₃Hex₅HexNAc₄ (*m/z* at 2591.5) *N*-glycans showed reduced expression after THP-1 differentiation, non fucosylated bi-antennary structures such as NeuAc₁Hex₅HexNAc₄ (*m/z* at 2431.4) were significantly over-expressed. Similarly, a higher level of tri-antennary *N*-glycan NeuAc₂Fuc₁Hex₆HexNAc₅ (*m/z* at 3416.5) was observed in differentiated THP-1 compared to undifferentiated cells. Then, a significant decrease of multi-fucosylated structures and an increase of sialylated structures were observed at the MS level in differentiated THP-1 cells (Fig. 4C and 4D). At the MS² level, the fragment ion at *m/z* 1021 that typifies sLe motif could only be observed in multi-fucosylated sialylated *N*-glycans isolated from undifferentiated THP-1 cells but not from differentiated cells, as exemplified by the fragmentation pattern of *N*-glycan at *m/z* 2966.5 (Fig. S-3) and 2779.4. However, because of its low intensity, this fragmentation event could not be established from all potentially sLe substituted *N*-glycans and the distribution of sLe should be determined by another method.

Finally, a significant decrease of multi-fucosylated structures and an increase of disialylated structures were observed in differentiated THP-1 cells (Fig. 4C and 4D).

As already mentioned, we further analyzed the *N*-glycans in native form to confirm the nature of the structural modifications induced by differentiation. However, in order to minimize in source desialylation, the released *N*-glycans were ethyl-esterified prior to MALDI-TOF-MS analysis. This chemical derivatization not only stabilizes sialic acid residues during MALDI-TOF-MS analysis, but also allows the discrimination of α 2,3- and α 2,6-linked *N*-acetylneuraminic acids that will be ethyl-esterified at the carboxyl group or form an inter-residual lactone, respectively²⁹. Consequently, whereas unmodified *N*-acetylneuraminic acid residues exhibit a mass increment of 291.10 Da, α 2,6-linked and α 2,3-linked variants exhibit masses of 319.13 Da and 273.08 Da, respectively. As previously observed for permethylated *N*-glycans, spectra of ethyl-esterified *N*-glycans from undifferentiated and differentiated THP-1 showed a majority of high-mannose structures (Fig. 5). Overall, similar *N*-glycan profiles were obtained in ethyl-esterified and permethylated forms. Nevertheless, it is noteworthy that the proportion of sialylated *N*-glycans was significantly lower in ethyl-esterified form than in permethylated form (25% vs. 38%). On the other hand, MS analysis of ethyl-esterified glycans permitted us to detect higher molecular weight molecules, including complex *N*-glycans with up to eight LacNAc units vs. four for permethylated glycans.

Comparison of ethyl-esterified *N*-glycans profiles from undifferentiated and differentiated THP-1 cells confirmed the results obtained from permethylated *N*-glycans. Indeed, cell

differentiation induced an overall increase of complex type *vs.* high mannose and in the average number of antennae as observed with permethylated *N*-glycans (Fig. S-4). Since we were able to observe larger *N*-glycans after ethyl-esterification, we confirmed the overall tendency toward an increase of antennae on LacNAc₄, LacNAc₅ and LacNAc₆ elongated complex *N*-glycans upon differentiation. Indeed, statistical analysis revealed that the differentiation induced a significant increase of intensity of compounds Fuc₁Hex₆HexNAc₅ (*m/z* 2174.7), Hex₇HexNAc₆ (*m/z* 2393.8), Hex₇HexNAc₆Fuc₁ (*m/z* 2539.9), Hex₈HexNAc₇Fuc₁ (*m/z* 2905.0) and Hex₉HexNAc₈Fuc₁ (*m/z* 3270.2) (Fig. S-5).

Finally, following PMA-induced differentiation of THP1, we observed a slight but significant decrease in the proportion of α 2,6-sialylation whereas the 2,3-sialylation was not affected (Fig. S-6).

Mass Spectrometry Analysis of *O*-Glycans

Reductive β -elimination was carried out to release *O*-glycans from *N*-deglycosylated peptides generated from THP-1 cells. Following purification on Dowex 50 \times 2 column, the *O*-glycans were permethylated and analyzed by MALDI-TOF MS/MS. The molecular ions were identified as *O*-glycans based on their calculated composition (Table IV). A majority of *O*-glycans were identified as core 1 (Gal β 1-3GalNAc) and core 2 (Gal β 1-3[GlcNAc β 1-6]GalNAc) *O*-glycans.

The MS profiles were dominated by signals at *m/z* 895.4 and 983.4 attributed to NeuAc₁Hex₁HexNAc-itol and Hex₂HexNAc₁HexNAc-itol *O*-glycans. Most *O*-glycans (55-60%) were sialylated, containing one or two sialic acid residues. In contrast, only 25% of total *O*-glycans were fucosylated and only two *O*-glycans contained both fucose and sialic acid residues such as Fuc₁NeuAc₁Hex₁HexNAc-itol (*m/z* 1069.4). Data extracted from MALDI-TOF-MS analyses of permethylated glycans showed no significant difference between the *O*-glycan profiles of undifferentiated and differentiated THP-1 cells, indicating that PMA treatment does not modify the overall *O*-glycans content of cells.

Flow cytometry analysis of sLe^x and Le^x expression, on monocytic and macrophagic-like THP-1 cells.

Lewis^x (Le^x) epitope (Galβ1-4[Fucα1-3]GlcNAcβ1) and its sialylated relative sialyl-Lewis^x (sLe^x) (NeuAcα2-3Galβ1-4[Fucα1-3]GlcNAcβ1) are among the most important selectin ligands expressed on cell surface glycoproteins and glycolipids of immune cells^{34,35}. Considering that the PMA-induced differentiation of THP1 into macrophages affects sialylation and fucosylation of complex *N*-glycans and potentially sLe distribution, as demonstrated by MS data, we have assessed the cell-surface expression of Le^x and sialyl-Le^x by flow cytometry using specific mAbs.

As shown in Figure 6, monocytic THP-1 cells are highly immunostained by both anti-sCD15 and anti-CD15 mAbs, demonstrating the presence of both sLe^x and Le^x epitopes at the cell surface. Similarly, Le^x is detected on macrophage-like cells. In contrast, no specific interaction of anti-sCD15 mAb with PMA-treated THP-1 was measured, as illustrated by overlapping signals with isotype control. This result reveals that sLe^x expression at the cell surface of monocytic THP-1 is highly down-regulated during PMA-induced differentiation.

qPCR analysis of glyco-genes expression levels

In order to correlate the modifications of glycan expression observed by mass spectrometry and FACS analysis upon THP-1 differentiation to biosynthesis pathways, the expression level of genes involved in *N*-glycan and GSL biosynthesis was established by qPCR (Fig. 7). At first, two genes encoding key enzymes involved in ganglioside biosynthesis were targeted: *ST3GAL5* encoding the G_{M3} synthase and *B4GALNT1* encoding the G_{M2}/G_{D2} synthase. As shown in Figure 7B, THP-1 differentiation induced a nine-fold overexpression of *ST3GAL5* that correlates well with the increase of G_{M3} synthesis whereas the expression of *B4GALNT1* was not modified in differentiated cells. Concerning *N*-glycan biosynthesis, genes encoding enzymes responsible for antennae branching and elongation were selected, including four *N*-acetylglucosaminyltransferases (*MGAT1*; *MGAT2*; *MGAT4A*; *MGAT5*) and two β-1,4-galactosyltransferases (*B4GALT1*; *B4GALT3*). As shown in Fig. 7, PMA treatment induced a three-fold increase of *MGAT1*, *MGAT5* and *B4GALT1* expression, which correlate with the increased biosynthesis of complex type *N*-glycans in differentiated cells. In contrast, the expression level of *MGAT2*, *MGAT4A* and *B4GALT3* were not affected by PMA treatment.

In addition, we investigated the expression of a panel of enzymes involved in the maturation of complex *N*-glycans including two sialyltransferase genes (*ST3GAL4* and *ST6GAL1*) respectively involved in α 2,3- and α 2,6-sialylation, two fucosyltransferase genes (*FUT4* and *FUT8*) respectively involved in α 1,3- and α 1,6-fucosylation, and the sialidase *NEU1* involved in the degradation of sialylated glycans. The gene encoding Neu1 was previously shown to be up-regulated in PMA-treated THP-1 and was used here as a control experiment³⁶. As observed in Figure 7B, *FUT8*, involved in α 1,6-core-fucosylation, was overexpressed with a three-fold increase whereas *FUT4*, involved in α 1,3-fucosylation, was down-expressed with a two-fold decrease. In case of sialylation, a moderate increase of *ST6GAL1* expression was detected.

DISCUSSION

THP-1 cell line is known to be a robust model to study monocytes/macrophages functions involved in innate immunity system^{19,21}. Carbohydrate chains linked to glycoproteins and glycolipids are ligands to both bacterial and immune lectins such as selectins, galectins or SIGLEC³⁷⁻³⁹. These lectin-glycan interactions regulate cell-cell and cell-extracellular matrix adhesion processes, cell differentiation, apoptosis mechanisms as well as signaling pathways involved in cytokine production and pathogen phagocytosis⁴⁰. The aim of this study was to highlight the glycome variation during the differentiation of the monocytic THP-1 cell line into macrophages. By combining different analytical approaches including the structural analysis of glycans by mass spectrometry, the detection of carbohydrate epitopes by flow cytometry and the quantification of expression level of glycosyltransferase-coding genes by qPCR, we showed that the monocyte-to-macrophage differentiation of THP-1 cells induced by PMA led to a large scale remodeling of glycosphingolipids and *N*-glycans patterns.

Here, we surveyed for the first time by mass spectrometry the expression pattern of all glycosphingolipids simultaneously and established that the synthesis of numerous gangliosides including G_{M3} , G_{M2} , G_{D3} , G_{M1} and G_{D1} was dramatically increased. The increase of gangliosides structures after THP-1 differentiation directly correlated with the robust overexpression of *ST3GAL5* (G_{M3} synthase) mRNA, but not of other glycosyltransferases such as *B4GALNT1* (G_{M2}/G_{D2} synthase). In agreement with our result on G_{M3} biosynthesis in THP-1, previous studies have demonstrated that PMA-induced differentiation of human HL-60 and U937 leukemic cell lines into macrophages, activates the PKC/ERK pathway, followed by an up-regulation of the G_{M3} synthase and G_{M3} level⁴¹⁻⁴³. Moreover, this high expression of G_{M3} synthase is not limited to promyelocytic cell lines. Gracheva *et al.* have reported the similar effect after differentiation of human blood monocytes into macrophages⁴⁴. Altogether, this strongly suggests that G_{M3} synthase may act as a metabolic bottleneck for the synthesis of the whole family of gangliosides, during monocyte-to-macrophage differentiation.

Along with glycosphingolipids, we have characterized the *N*-glycosylation pattern of THP-1 monocytes and macrophages using two different sample preparation methods followed by MALDI-TOF-MS analysis. On one hand, *N*-glycans were released in solution from glycopeptides and then per-*O*-methylated in order to increase the detection sensitivity in MS, avoid in-source and post-source losses of *N*-acetylneuraminic acids and obtain some linkage information deduced from MS/MS fragmentation^{30,45}. In parallel, we used a recently developed

high throughput sample preparation method which consists of releasing protein *N*-glycans in a 96-well PVDF-membrane filter plate followed by chemical ethyl-esterification of glycans enabling the stabilization and mass discrimination of α 2,3- and α 2,6-linked *N*-acetylneuraminic acids^{29,46}. Of note, our aim was not to compare the performances (throughput, sensitivity, robustness...) of these two methods but rather to obtain complementary data regarding the structure of *N*-glycans. Although similar glycoforms were observed in MS spectra of permethylated and ethyl-esterified *N*-glycans, we noticed some discrepancies regarding the proportion of glycan species and glycan-derived traits. For instance, the level of sialylated *N*-glycans was significantly lower in ethyl-esterified glycan spectra than in the permethylated counterparts (25% vs. 38%), while no difference was observed for the percentage of fucosylated species (80%). Such differences were expected since the two sample preparation methods differ in many respects (*i.e.* proteins extraction/denaturation, glycan release and derivatization, purification of derivatized glycans...). Nonetheless, despite these differences, both methods revealed an increase in the proportion of complex type *N*-glycans. Indeed, whereas high mannose type *N*-glycans were the predominant type in monocytic THP-1 cells, as previously reported in CFG data base (<http://www.functionalglycomics.org/glycomics/publicdata/glycoprofiling.jsp>)⁴⁷, complex type *N*-Glycans represented the major type in differentiated THP-1 cells. This increase of complex type *N*-glycans directly correlated with an overexpression of a panel of enzymes mRNAs that play key roles in the regulation of *N*-glycans maturation. In particular, three β -*N*-acetylglucosaminyltransferases (*MGAT1*; *MGAT4A*; *MGAT5*) that are involved in the initiation of *N*-Glycans branching were significantly overexpressed following PMA treatment. In contrast to THP-1, it was reported that in HL-60, *MGAT1* and *MGAT5* were down-regulated after PMA differentiation^{48,49}. In the same direction, a moderate increase of *ST6GAL1* expression was detected on PMA-differentiated THP-1 cells, whereas this enzyme was down-regulated in HL-60⁵⁰. This discrepancy may be explained by differential regulation of glycosyltransferases genes expression between these two leukemia cell lines, as previously described by Gassen *et al.*⁵¹.

Furthermore, our result showed an increase of *B4GALT1* expression, a β -1,4-galactosyltransferase involved in the synthesis of type-2 polyLacNAc epitopes. This enzyme could be responsible of the increase of polyLacNAc structures as observed by mass spectrometry after THP-1 cell differentiation. These polyLacNAc structures may serve as acceptors for different modifications like sialylation and fucosylation. In the present study, we

detected complex-type *N*-glycans predominantly mono-fucosylated and a decrease of multi-fucosylated *N*-glycans structures after PMA-treatment. This result was supported by the increase of *FUT8* mRNA level and the decrease of *FUT4* mRNA level. *FUT8* is an α -1,6-fucosyltransferase which is responsible of addition of fucose to the first GlcNAc residue in *N*-glycans. Accordingly, using flow cytometry, Plattner *et al.*²³ have previously observed an increased binding of LCA (*Lens culinaris* agglutinin), a lectin that recognizes complex di- and tri- antennary *N*-glycans with a fucose linked α 1,6 to GlcNAc core⁵², following PMA-induced differentiation of THP1 cells. Fucosylation may modulate various biological activities of phagocytes as presentation and capture of antigens as well as polarization M1/M2 of macrophages⁵³.

We then observed, as Stamatou *et al.*⁵⁴ did, an overexpression of *NEU1*, a lysosomal neuraminidase known to migrate to the plasma membrane during monocyte differentiation. Another sialidase *NEU3*, located to the plasma membrane, has been described to be down-regulated on PMA-differentiated THP-1 cells³⁶. This overexpression of *NEU1* could be responsible for the α 2,6 sialylation decline and the decrease of cell surface sLe^x epitopes on THP-1 macrophagic cells detected using a specific anti-sLe^x antibody. Several studies have also shown the loss of sLe^x epitope during differentiation of monocytic U937 and HL-60 cell lines into macrophages⁵⁵⁻⁵⁷. Furthermore, Julien *et al.*³ have demonstrated that sLe^x epitope on *O*-glycans of P-selectin glycoprotein ligand-1 is regulated during dendritic cells differentiation. However, we could not observe any significant variation of *O*-glycosylation pattern of THP1 during macrophage differentiation. This strongly suggests that sLe^x variation on THP-1 is controlled by *N*-glycosylation. Sialylation regulates cell adhesion and apoptosis process of monocytes/macrophages⁵⁸⁻⁶⁰. PMA treatment of monocytes induced hyposialylation of α 5 β 1 integrin via PKC/ERK signaling pathway and increased cell adhesion to fibronectin^{58,59}. The adhesion cell mediated by α 5 β 1 integrin is also regulated by expression level of *MGAT5*, and its activity is involved in adhesion and transmigration of THP-1 monocyte cells⁶¹. The relative activities of these different glycosyltransferases seem to be crucial to cell differentiation.

CONCLUSION

In conclusion, we provide here a descriptive study which highlights the glycosylation changes associated with the differentiation of monocytic THP-1 cells line into macrophages. Indeed, despite the recognized importance of glycosylation in the regulation of multiple biological processes involved in immunity and cancer, little was known about the glycosylation changes that occur during the differentiation of monocytes into macrophages. Here, we demonstrated that the patterns of major surface glycans, including glycosphingolipids and *N*-glycans, are dramatically modified upon PMA activation. These changes were partially associated to the expression level of a subset of glycosyltransferases known to regulate cell-surface sialylation. Presently, further research is under way to determine how these glycan may modulate the functional activity of immune cells by affecting the innate and acquired immune responses via lectin-dependent pathway. Also, efforts are being made to extend these results to differentiation/polarization of human blood monocytes into classically (M1) and alternatively (M2) activated macrophages.

FIGURES

Figure 1. Expression of the cell surface marker CD11c on macrophage-like THP-1. Monocytic THP-1 cells were untreated (A) or incubated with 20 nM PMA (B) to induce the differentiation into macrophages. After 72h, the surface expression level of CD11c was quantified by flow cytometry using a specific anti-CD11c antibody. The data shown is from one representative experiment out of three independent experiments with similar results. Dotted lines, autofluorescence; grey peaks, control isotype; black lines, anti-CD11c.

Figure 2: MALDI-TOF-MS profiles and calculated composition of permethylated glycosphingolipids isolated from undifferentiated and PMA-treated THP-1 cells. **A.** Comparison of MS profiles of permethylated glycosphingolipids purified from undifferentiated and PMA-differentiated THP-1 cells. GSL are present as d18:1/C16:0 (Cer*) and d18:1/C24:0 (Cer**) isomers. ●, galactose; ●, glucose; ■, *N*-acetylgalactosamine; ◆, *N*-acetylneuraminic acid. **B.** Glycosphingolipids composition from undifferentiated and PMA-differentiated THP-1 cells deduced from MALDI-TOF-MS/MS analyses. Statistical significance compared with undifferentiated cells (***) $p < 0.001$; (**) $p < 0.01$ is determined by a t-test using GraphPad Prism 5 software. Data represent median \pm interquartile range from seven independent experiments.

Figure 3: Comparison of MS profiles of permethylated *N*-glycans purified from undifferentiated (A) and PMA-differentiated THP-1 cells (B). Major glycan peaks are annotated and represent compositions. ●, mannose; ●, galactose; ●, glucose; ■, *N*-acetylgalactosamine; ◆, *N*-acetylneuraminic acid; ▲, fucose. These spectra are representative of six different experiments.

Figure 4: Structural modification of *N*-glycans profile upon THP-1 differentiation by MS analysis of permethylated glycans. (A) Ratios of complex and high-mannose types *N*-Glycans on THP-1 cells; (B) Proportions of multi-antennary complex-type *N*-glycans; (C) Fucosylation of complex type *N*-glycans, (D). Sialylation of complex type *N*-glycans. White bars: Undifferentiated THP-1; gray bars: PMA-differentiated THP-1. Statistical significance compared with undifferentiated cells (***) $p < 0.001$; (**) $p < 0.01$ was determined by a two-tailed

t-test using GraphPad Prism 5 software. Data represent median \pm interquartile range from six independent experiments.

Figure 5: Comparison of MS profiles of ethyl-esterified *N*-glycans purified from undifferentiated (A) and PMA-differentiated THP-1 cells (B). Major glycan peaks are annotated and represent compositions. ●, mannose; ○, galactose; ●, glucose; ■, *N*-acetylgalactosamine; ◆, α 2-3 *N*-acetylneuraminic acid; ▲, fucose. These spectra are representative of three experiments.

Figure 6: Detection of cell surface sLe^x and Le^x epitopes on monocytic and macrophagic THP-1 cells. Cells are incubated in presence of either fluorescent-conjugated anti-sLe^x (sCD15) or anti-Le^x (CD15) antibodies, as described in Materials and Methods section. These data obtained by flow cytometry are representative for three independent experiments performed in duplicate. White peaks show non-specific isotype control.

Figure 7: Schematic representation of gangliosides and *N*-glycans biosynthesis pathway (A) and comparison of glycosyltransferases involved in *N*-glycan and GSL biosynthesis (B). mRNA from undifferentiated and PMA-differentiated THP-1 cells were harvested and measured by qPCR. Quantification was performed by the method described by Pfaffl²⁷ and normalized to HPRT. Data represent the SEM of triplicate from three-independent experiments.

TABLES

Table I Nucleotide sequences of qPCR primers. HPRT, ST3GAL5 and GALNT1 primers were from Cazet *et al.*⁶², NEU1 primers from Cross *et al.*⁶³, ST6GAL1 and FUT4 primers from Groux-Degroote *et al.*⁶⁴, and other primers were from Garcia-Vallejo *et al.*⁶⁵.

Primer	Sequence 5' →3'	Reference
HPRT F	GCCAGACTTTGTTGGATTTG	62
HPRT R	CTCTCATCTTAGGCTTTGTATTTTG	
ST3GAL4 F	ATAAGAAGCGGGTGCGAAAGGG	65
ST3GAL4 R	TCCGTGGCTGTTGCATTGGC	
ST3GAL5 F	ATCGGTGTCATTGCCGTTGT	62
ST3GAL5 R	TTCATAGCAGCCATGCATTGA	
B4GALNT1 F	CAGCGCTCTAGTCACGATTGC'	62
B4GALNT1 R	CCACGGTAACCGTTGGGTAG	
GnTV F	GATGTGCTTTTCTGAATCCCAAGT	65
GnTV R	-GGACTTGCTGACCATGTTT	
ST6GAL1 F	CATCCAAGCGCAAGACTGACG	64
ST6GAL1 R	TGTGCCCTGGTTGAGATGCTTC	
FUT4 F	GAGCTACGCTGTCCACATCACC	64
FUT4 R	CAGCTGGCCAAGTTCCGTATG	
FUT8 F	TCTTCATCCCCGTCCTCCA	65
FUT8 R	GAGACACCCACCACACTGCA	
β4GalT1 F	AACTTGACCTCGGTCCCAGTGC	65
β4GalT1 R	GGCCGCCCATCTTCACATTG	
βGalT3 F	TAGTGGGTCCTGTGTCGGTGTC	65
βGalT3 R	AGGCACAATGATGGCTGTTTCG	
MGAT1 F	GGTGATTCCCATCCTGGTCAT	65
MGAT1 R	TCAGCCGAGGGCCGATA	
MGAT2 F	TCCGGTCTGCAGGTGTTT	65
MGAT2 R	CAATCTCTAGGGTCACTACCTGGAA	
MGAT4A F	CTGTGGAAGTTTTGCCTTTTAAGAG	65
MGAT4A R	TGAAATGGGATTGAGACTTGGA	
NEU1 F	TGTGACCTTCGACCCTGAGC	63
NEU1 R	TCGCAGGGTCAGGTTCACTC	

Table II Assignment of molecular ions ($[M + Na]^+$) observed in MALDI-TOF spectra of permethylated glycosphingolipids of undifferentiated and PMA-differentiated THP-1 cells. nd, non-detected.

Fatty acids	GSLs	Mono-isotopic molecular masses			Composition
		Theoretical	Undifferentiated	Differentiated	
C16:0	LacCer	1010.8	1010.7	1010.7	Hex ₂ -Cer ⁵⁴⁸
C24:0	LacCer	1122.9	1122.8	1122.8	Hex ₂ -Cer ⁶⁶⁰
C16:0	G _{b3}	1214.9	1214.7	1214.8	Hex ₃ -Cer ⁵⁴⁸
C24:0	G _{b3}	1326.9	1326.9	1326.9	Hex ₃ -Cer ⁶⁶⁰
C16:0	G _{M3}	1372.0	nd	1371.8	NeuAc ₁ Hex ₂ -Cer ⁵⁴⁸
C24:0	G _{M3}	1484.0	nd	1484.0	NeuAc ₁ Hex ₂ -Cer ⁶⁶⁰
C16:0	G _{b4} /G _{A1}	1460.0	1459.8	1459.9	Hex ₃ HexNAc ₁ -Cer ⁵⁴⁸
C24:0	G _{b4} /G _{A1}	1572.1	1572.0	1572.0	Hex ₃ HexNAc ₁ -Cer ⁶⁶⁰
C16:0	G _{M2}	1617.1	nd	1616.9	NeuAc ₁ Hex ₂ HexNAc ₁ -Cer ⁵⁴⁸
C24:0	G _{M2}	1729.2	nd	1729.1	NeuAc ₁ Hex ₂ HexNAc ₁ -Cer ⁶⁶⁰
C16:0	G _{D3}	1733.1	nd	1733.0	NeuAc ₂ Hex ₂ -Cer ⁵⁴⁸
C24:0	G _{D3}	1845.2	nd	1845.1	NeuAc ₂ Hex ₂ -Cer ⁶⁶⁰
C16:0	G _{M1a/b}	1821.2	1821.0	1821.1	NeuAc ₁ Hex ₃ HexNAc ₁ -Cer ⁵⁴⁸
C24:0	G _{M1a/b}	1933.3	1933.1	1933.2	NeuAc ₁ Hex ₃ HexNAc ₁ -Cer ⁶⁶⁰
C16:0	G _{D1a}	2182.3	nd	2182.2	NeuAc ₂ Hex ₃ HexNAc ₁ -Cer ⁵⁴⁸
C24:0	G _{D1a}	2294.4	nd	2294.3	NeuAc ₂ Hex ₃ HexNAc ₁ -Cer ⁶⁶⁰

Table III Assignment of molecular ions ($[M + Na]^+$) observed in MALDI-TOF spectra of permethylated and native *N*-glycans THP-1 cells.

	Theoretical mono-isotopic molecular masses		Composition
	Native	Permethylated	
High Mannose	1257.4	1579.8	Hex ₅ HexNAc ₂
	1419.5	1783.9	Hex ₆ HexNAc ₂
	1581.5	1988.0	Hex ₇ HexNAc ₂
	1743.6	2192.1	Hex ₈ HexNAc ₂
	1905.6	2396.2	Hex ₉ HexNAc ₂
	2067.7	2600.3	Hex ₁₀ HexNAc ₂
Bi-antennary	1282.5	1590.8	Fuc ₁ Hex ₃ HexNAc ₃
	1298.5	1620.8	Hex ₄ HexNAc ₃
	1485.5	1835.9	Fuc ₁ Hex ₃ HexNAc ₄
	1663.6	2070.0	Hex ₄ HexNAc ₅
	1688.6	2081.1	Fuc ₁ Hex ₃ HexNAc ₅
	1809.6	2244.1	Fuc ₁ Hex ₅ HexNAc ₄
	1955.7	2418.2	Fuc ₂ Hex ₅ HexNAc ₄
	1954.7	2431.2	NeuAc ₁ Hex ₅ HexNAc ₄
	2101.8	2592.3	Fuc ₃ Hex ₅ HexNAc ₄
	2100.7	2605.3	NeuAc ₁ Fuc ₁ Hex ₅ HexNAc ₄
	2246.8	2779.4	NeuAc ₁ Fuc ₂ Hex ₅ HexNAc ₄
	2245.8	2792.4	NeuAc ₂ Hex ₅ HexNAc ₄
	2391.8	2966.5	NeuAc ₂ Fuc ₁ Hex ₅ HexNAc ₄
	2537.9	3140.6	NeuAc ₂ Fuc ₂ Hex ₅ HexNAc ₄
2684.0	3314.7	NeuAc ₂ Fuc ₃ Hex ₅ HexNAc ₄	
Tri-antennary	2028.7	2519.3	Hex ₆ HexNAc ₅
	2174.8	2693.4	Fuc ₁ Hex ₆ HexNAc ₅
	2319.8	2880.4	NeuAc ₁ Hex ₆ HexNAc ₅
	2465.9	3054.5	NeuAc ₁ Fuc ₁ Hex ₆ HexNAc ₅
	2610.9	3241.6	NeuAc ₂ Hex ₆ HexNAc ₅
	2757.0	3415.7	NeuAc ₂ Fuc ₁ Hex ₆ HexNAc ₅
	2903.0	3589.8	NeuAc ₂ Fuc ₂ Hex ₆ HexNAc ₅
	2902.0	3602.8	NeuAc ₃ Hex ₆ HexNAc ₅
	3048.1	3776.9	NeuAc ₃ Fuc ₁ Hex ₆ HexNAc ₅
Tetra-antennary	2393.9	2968.5	Hex ₇ HexNAc ₆
	2539.9	3142.6	Fuc ₁ Hex ₇ HexNAc ₆
	2684.8	3329.7	NeuAc ₁ Hex ₇ HexNAc ₆
	2831.0	3503.8	NeuAc ₁ Fuc ₁ Hex ₇ HexNAc ₆
	2976.0	3690.8	NeuAc ₂ Hex ₇ HexNAc ₆
	3122.1	3864.9	NeuAc ₂ Fuc ₁ Hex ₇ HexNAc ₆
	3267.1	4052.0	NeuAc ₃ Hex ₇ HexNAc ₆

3413.2	4226.1	NeuAc ₃ Fuc ₁ Hex ₇ HexNAc ₆
3558.2	4413.2	NeuAc ₄ Hex ₇ HexNAc ₆
3704.3	4587.3	NeuAc ₄ Fuc ₁ Hex ₇ HexNAc ₆

Table IV Assignment of molecular ions ($[M + Na]^+$) observed in MALDI-TOF spectra of permethylated *O*-glycans of undifferentiated and PMA-differentiated THP-1 cells.

Mono-isotopic molecular masses			Composition
Theoretical	Undifferentiated	Differentiated	
895.5	895.4	895.4	NeuAc ₁ Hex ₁ HexNAc-ol
983.5	983.4	983.4	Hex ₂ HexNAc ₁ HexNAc-ol
1069.6	1069.4	1069.4	NeuAc ₁ Fuc ₁ Hex ₁ HexNAc-ol
1157.6	1157.5	1157.5	Fuc ₁ Hex ₂ HexNAc ₁ HexNAc-ol
1228.6	1228.5	1228.5	Hex ₂ HexNAc ₂ HexNAc-ol
1256.6	1256.5	1256.5	NeuAc ₂ Hex ₁ NeuAc ₂ HexNAc-ol
1344.7	1344.6	1344.5	NeuAc ₁ Hex ₂ HexNAc ₁ HexNAc-ol
1361.7	1361.6	1361.6	Fuc ₁ Hex ₃ HexNAc ₁ HexNAc-ol
1606.8	1606.7	1606.7	Fuc ₁ Hex ₃ HexNAc ₂ HexNAc-ol
1705.9	1705.7	1705.7	NeuAc ₂ Hex ₂ HexNAc ₁ HexNAc-ol

ASSOCIATED CONTENT

This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

Six supplementary Figures (Fig.S-1 to S-6) : MS/MS sequencing of permethylated GSLs, MS/MS sequencing of complex *N*-glycans and quantifications of *N*-glycans modifications.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

* Y. G. : E. mail: yann.guerardel@univ.lille1.fr Tel : +33(0)320436941

* E. E. : E. mail: elisabeth.eless@univ.lille1.fr Tel : +33(0)320334142

Present Address

† Y.R. : Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, Université de Toulouse, CNRS,
UPS, France

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The work was supported by the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (to CD), and by the European Union (Seventh Framework Programme HighGlycan project, grant number: 278535). We are grateful to Marlène Mortuaire for technical advice in cell culture. We are indebted to the Research Federation FRABio (Univ. Lille, CNRS, FR 3688, FRABio, Biochimie Structurale et Fonctionnelle des Assemblages Biomoléculaires) for providing the scientific and technical environment conducive to achieving this work.

ABBREVIATIONS

Cer, Ceramide; EDC, N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide; Fuc, Fucose; Gal, Galactose; GalNAc, *N*-acetylgalactosamine; Glc, Glucose; GlcNAc, *N*-acetylglucosamine; GSL, Glycosphingolipid; HOBt, Hydroxybenzotriazole; HPRT, Hypoxanthine-guanine PhosphoRibosylTransferase; LacNAc, *N*-acetyl-lactosamine; Le^x, Lewis x; MALDI, Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization; MHC, Major histocompatibility complex; MS, Mass spectrometry; NeuAc, *N*-acetylneuraminic acid; NS, Non-significant; PMA, Phorbol 12-myristate 13-acetate; sLe^x, Sialyl- lewis x; TFA, Trifluoroacetic acid; TOF, Time of flight

REFERENCES

- (1) Gordon, S.; Taylor, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* **2005**, *5* (12), 953–964.
- (2) Bax, M.; García-Vallejo, J. J.; Jang-Lee, J.; North, S. J.; Gilmartin, T. J.; Hernández, G.; Crocker, P. R.; Leffler, H.; Head, S. R.; Haslam, S. M.; *et al.* Dendritic cell maturation results in pronounced changes in glycan expression affecting recognition by siglecs and galectins. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **2007**, *179* (12), 8216–8224.
- (3) Julien, S.; Grimshaw, M. J.; Sutton-Smith, M.; Coleman, J.; Morris, H. R.; Dell, A.; Taylor-Papadimitriou, J.; Burchell, J. M. Sialyl-Lewis(x) on P-selectin glycoprotein ligand-1 is regulated during differentiation and maturation of dendritic cells: a mechanism involving the glycosyltransferases C2GnT1 and ST3Gal I. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **2007**, *179* (9), 5701–5710.
- (4) Trottein, F.; Schaffer, L.; Ivanov, S.; Paget, C.; Vendeville, C.; Cazet, A.; Groux-Degroote, S.; Lee, S.; Krzewinski-Recchi, M.-A.; Faveeuw, C.; *et al.* Glycosyltransferase and sulfotransferase gene expression profiles in human monocytes, dendritic cells and macrophages. *Glycoconj. J.* **2009**, *26* (9), 1259–1274.
- (5) Kohro, T.; Tanaka, T.; Murakami, T.; Wada, Y.; Aburatani, H.; Hamakubo, T.; Kodama, T. A comparison of differences in the gene expression profiles of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiated THP-1 cells and human monocyte-derived macrophage. *J. Atheroscler. Thromb.* **2004**, *11* (2), 88–97.
- (6) Lau, K. S.; Dennis, J. W. N-Glycans in cancer progression. *Glycobiology* **2008**, *18* (10), 750–760.
- (7) Ryan, S. O.; Cobb, B. A. Host glycans and antigen presentation. *Microbes Infect. Inst. Pasteur* **2012**, *14* (11), 894–903.
- (8) Moremen, K. W.; Tiemeyer, M.; Nairn, A. V. Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2012**, *13* (7), 448–462.
- (9) Wolfert, M. A.; Boons, G.-J. Adaptive immune activation: glycosylation does matter. *Nat. Chem. Biol.* **2013**, *9* (12), 776–784.
- (10) Silva, Z.; Tong, Z.; Guadalupe Cabral, M.; Martins, C.; Castro, R.; Reis, C.; Trindade, H.; Konstantopoulos, K.; Videira, P. A. Sialyl Lewisx-dependent binding of human monocyte-derived dendritic cells to selectins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2011**, *409* (3), 459–464.
- (11) Nonaka, M.; Ma, B. Y.; Murai, R.; Nakamura, N.; Baba, M.; Kawasaki, N.; Hodohara, K.; Asano, S.; Kawasaki, T. Glycosylation-Dependent Interactions of C-Type Lectin DC-SIGN with Colorectal Tumor-Associated Lewis Glycans Impair the Function and Differentiation of Monocyte-Derived Dendritic Cells. *J. Immunol.* **2008**, *180* (5), 3347–3356.
- (12) Neyrolles, O.; Guilhot, C. Recent advances in deciphering the contribution of Mycobacterium tuberculosis lipids to pathogenesis. *Tuberculosis* **2011**, *91* (3), 187–195.
- (13) Holmgren, J.; Svennerholm, A. M. Mechanisms of disease and immunity in cholera: a review. *J. Infect. Dis.* **1977**, *136 Suppl*, S105–S112.
- (14) Mitoma, J.; Bao, X.; Petryanik, B.; Schaerli, P.; Gauguier, J.-M.; Yu, S.-Y.; Kawashima, H.; Saito, H.; Ohtsubo, K.; Marth, J. D.; *et al.* Critical functions of N-glycans in L-selectin-mediated lymphocyte homing and recruitment. *Nat. Immunol.* **2007**, *8* (4), 409–418.
- (15) Su, Y.; Bakker, T.; Harris, J.; Tsang, C.; Brown, G. D.; Wormald, M. R.; Gordon, S.; Dwek, R. A.; Rudd, P. M.; Martinez-Pomares, L. Glycosylation influences the lectin activities of the macrophage mannose receptor. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (38), 32811–32820.

- (16) Togayachi, A.; Kozono, Y.; Ishida, H.; Abe, S.; Suzuki, N.; Tsunoda, Y.; Hagiwara, K.; Kuno, A.; Ohkura, T.; Sato, N.; *et al.* Polylactosamine on glycoproteins influences basal levels of lymphocyte and macrophage activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104* (40), 15829–15834.
- (17) Tsuchiya, S.; Yamabe, M.; Yamaguchi, Y.; Kobayashi, Y.; Konno, T.; Tada, K. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* **1980**, *26* (2), 171–176.
- (18) Auwerx, J. The human leukemia cell line, THP-1: a multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. *Experientia* **1991**, *47* (1), 22–31.
- (19) Chanput, W.; Mes, J. J.; Wichers, H. J. THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach. *Int. Immunopharmacol.* **2014**, *23* (1), 37–45.
- (20) Park, E. K.; Jung, H. S.; Yang, H. I.; Yoo, M. C.; Kim, C.; Kim, K. S. Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli. *Inflamm. Res. Off. J. Eur. Histamine Res. Soc. Al* **2007**, *56* (1), 45–50.
- (21) Daigneault, M.; Preston, J. A.; Marriott, H. M.; Whyte, M. K. B.; Dockrell, D. H. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PloS One* **2010**, *5* (1), e8668.
- (22) Schwende, H.; Fitzke, E.; Ambs, P.; Dieter, P. Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin D3. *J. Leukoc. Biol.* **1996**, *59* (4), 555–561.
- (23) Plattner, V. E.; Ratzinger, G.; Engleder, E. T.; Gallauner, S.; Gabor, F.; Wirth, M. Alteration of the glycosylation pattern of monocytic THP-1 cells upon differentiation and its impact on lectin-mediated drug delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm. Off. J. Arbeitsgemeinschaft Für Pharm. Verfahrenstechnik EV* **2009**, *73* (3), 324–330.
- (24) Wang, D.; Ozhegov, E.; Wang, L.; Zhou, A.; Nie, H.; Li, Y.; Sun, X.-L. Sialylation and desialylation dynamics of monocytes upon differentiation and polarization to macrophages. *Glycoconj. J.* **2016**.
- (25) Tsuchiya, S.; Kobayashi, Y.; Goto, Y.; Okumura, H.; Nakae, S.; Konno, T.; Tada, K. Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester. *Cancer Res.* **1982**, *42* (4), 1530–1536.
- (26) Prieto, J.; Eklund, A.; Patarroyo, M. Regulated expression of integrins and other adhesion molecules during differentiation of monocytes into macrophages. *Cell. Immunol.* **1994**, *156* (1), 191–211.
- (27) Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29* (9), e45.
- (28) Holst, S.; Deuss, A. J. M.; van Pelt, G. W.; van Vliet, S. J.; Garcia-Vallejo, J. J.; Koeleman, C. A. M.; Deelder, A. M.; Mesker, W. E.; Tollenaar, R. A.; Rombouts, Y.; *et al.* N-glycosylation Profiling of Colorectal Cancer Cell Lines Reveals Association of Fucosylation with Differentiation and Caudal Type Homeobox 1 (CDX1)/Villin mRNA Expression. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **2016**, *15* (1), 124–140.
- (29) Reiding, K. R.; Blank, D.; Kuijper, D. M.; Deelder, A. M.; Wührer, M. High-throughput profiling of protein N-glycosylation by MALDI-TOF-MS employing linkage-specific sialic acid esterification. *Anal. Chem.* **2014**, *86* (12), 5784–5793.
- (30) Ciucanu, I.; Kerek, F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydr. Res.* **1984**, *131* (2), 209–217.
- (31) Sonnino, S.; Mauri, L.; Chigorno, V.; Prinetti, A. Gangliosides as components of lipid membrane domains. *Glycobiology* **2006**, *17* (1), 1R – 13R.
- (32) Aoki, K.; Perlman, M.; Lim, J.-M.; Cantu, R.; Wells, L.; Tiemeyer, M. Dynamic developmental elaboration of N-linked glycan complexity in the *Drosophila melanogaster* embryo. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282* (12), 9127–9142.

- (33) Wada, Y.; Azadi, P.; Costello, C. E.; Dell, A.; Dwek, R. A.; Geyer, H.; Geyer, R.; Kakehi, K.; Karlsson, N. G.; Kato, K.; *et al.* Comparison of the methods for profiling glycoprotein glycans--HUPO Human Disease Glycomics/Proteome Initiative multi-institutional study. *Glycobiology* **2007**, *17* (4), 411–422.
- (34) Munro, J. M.; Lo, S. K.; Corless, C.; Robertson, M. J.; Lee, N. C.; Barnhill, R. L.; Weinberg, D. S.; Bevilacqua, M. P. Expression of sialyl-Lewis X, an E-selectin ligand, in inflammation, immune processes, and lymphoid tissues. *Am. J. Pathol.* **1992**, *141* (6), 1397–1408.
- (35) Wagers, A. J.; Stoolman, L. M.; Kannagi, R.; Craig, R.; Kansas, G. S. Expression of leukocyte fucosyltransferases regulates binding to E-selectin: relationship to previously implicated carbohydrate epitopes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **1997**, *159* (4), 1917–1929.
- (36) Liang, F.; Seyrantepe, V.; Landry, K.; Ahmad, R.; Ahmad, A.; Stamatou, N. M.; Pshezhetsky, A. V. Monocyte differentiation up-regulates the expression of the lysosomal sialidase, Neu1, and triggers its targeting to the plasma membrane via major histocompatibility complex class II-positive compartments. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281* (37), 27526–27538.
- (37) Macauley, M. S.; Crocker, P. R.; Paulson, J. C. Siglec-mediated regulation of immune cell function in disease. *Nat. Rev. Immunol.* **2014**, *14* (10), 653–666.
- (38) Mondal, N.; Buffone, A.; Stolfa, G.; Antonopoulos, A.; Lau, J. T. Y.; Haslam, S. M.; Dell, A.; Neelamegham, S. ST3Gal-4 is the primary sialyltransferase regulating the synthesis of E-, P-, and L-selectin ligands on human myeloid leukocytes. *Blood* **2015**, *125* (4), 687–696.
- (39) Chung, A. W.; Sieling, P. A.; Schenk, M.; Teles, R. M. B.; Krutzik, S. R.; Hsu, D. K.; Liu, F.-T.; Sarno, E. N.; Rea, T. H.; Stenger, S.; *et al.* Galectin-3 Regulates the Innate Immune Response of Human Monocytes. *J. Infect. Dis.* **2013**, *207* (6), 947–956.
- (40) Park, S.-S.; Kim, W.-J.; Moon, S.-K. Suppression of vascular smooth muscle cell responses induced by TNF- α in GM3 synthase gene transfected cells. *Int. J. Mol. Med.* **2011**, *27* (1), 147–154.
- (41) Momoi, T.; Shinmoto, M.; Kasuya, J.; Senoo, H.; Suzuki, Y. Activation of CMP-N-acetylneuraminic acid: lactosylceramide sialyltransferase during the differentiation of HL-60 cells induced by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *J. Biol. Chem.* **1986**, *261* (34), 16270–16273.
- (42) Nojiri, H.; Takaku, F.; Terui, Y.; Miura, Y.; Saito, M. Ganglioside GM3: an acidic membrane component that increases during macrophage-like cell differentiation can induce monocytic differentiation of human myeloid and monocytoid leukemic cell lines HL-60 and U937. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1986**, *83* (3), 782–786.
- (43) Choi, H.-J.; Park, Y.-G.; Kim, C.-H. Lactosylceramide α 2,3-sialyltransferase is induced via a PKC/ERK/CREB-dependent pathway in K562 human leukemia cells. *Mol. Cells* **2007**, *23* (2), 138–144.
- (44) Gracheva, E. V.; Samovilova, N. N.; Golovanova, N. K.; Andreeva, E. R.; Andrianova, I. V.; Tararak, E. M.; Prokazova, N. V. Activation of ganglioside GM3 biosynthesis in human monocyte/macrophages during culturing in vitro. *Biochem. Biokhimiia* **2007**, *72* (7), 772–777.
- (45) Domon, B.; Costello, C. E. A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates. *Glycoconj. J.* **1988**, *5* (4), 397–409.
- (46) Holst, S.; Deuss, A. J.; van Pelt, G. W.; van Vliet, S. J.; Garcia-Vallejo, J. J.; Koeleman, C. A.; Deelder, A. M.; Mesker, W. E.; Tollenaar, R. A.; Rombouts, Y.; *et al.* N-glycosylation profiling of colorectal cancer cell lines reveals association of fucosylation

- with differentiation and CDX1/villin mRNA expression. *Mol. Cell. Proteomics* **2015**, mcp – M115.
- (47) Home: Functional Glycomics Gateway <http://www.functionalglycomics.org/fg/> (accessed Nov 16, 2015).
- (48) Liu, A. H.; Liu, F.; Li, Z.; Gu, J. X.; Chen, H. L. Alterations in glycosyltransferases during myeloid and monocytoid differentiation of HL-60 cells. *Cell Biol. Int.* **1998**, *22* (7), 545–550.
- (49) Zhao, J.-H.; Zhang, Y.; Zhang, X.-Y.; Chen, H.-L. Alteration in the expression of early stage processing enzymes of N-glycan during myeloid and monocytoid differentiation of HL-60 cells. *Leuk. Res.* **2003**, *27* (7), 599–605.
- (50) Taniguchi, A.; Higai, K.; Hasegawa, Y.; Utsumi, K.; Matsumoto, K. Differentiation elicits negative regulation of human β -galactoside α 2,6-sialyltransferase at the mRNA level in the HL-60 cell line. *FEBS Lett.* **1998**, *441* (2), 191–194.
- (51) Gassen, U.; Kelm, S.; Schauer, R. Differential gene expression of a human alpha2,3-sialyltransferase in leukaemic cell lines and leucocytes. *FEBS Lett.* **1998**, *427* (1), 91–95.
- (52) Cummings, R. D.; Etzler, M. E. Antibodies and Lectins in Glycan Analysis. In *Essentials of Glycobiology*; Varki, A., Cummings, R. D., Esko, J. D., Freeze, H. H., Stanley, P., Bertozzi, C. R., Hart, G. W., Etzler, M. E., Eds.; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor (NY), 2009.
- (53) Li, J.; Hsu, H.-C.; Ding, Y.; Li, H.; Wu, Q.; Yang, P.; Luo, B.; Rowse, A. L.; Spalding, D. M.; Bridges, S. L.; *et al.* Inhibition of fucosylation reshapes inflammatory macrophages and suppresses type II collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ* **2014**, *66* (9), 2368–2379.
- (54) Stamatou, N. M.; Liang, F.; Nan, X.; Landry, K.; Cross, A. S.; Wang, L.-X.; Pshezhetsky, A. V. Differential expression of endogenous sialidases of human monocytes during cellular differentiation into macrophages: Sialidase expression in monocytes/macrophages. *FEBS J.* **2005**, *272* (10), 2545–2556.
- (55) Trabelsi, N.; Greffard, A.; Pairon, J.-C.; Bignon, J.; Zanetti, G.; Fubini, B.; Pilatte, Y. Alterations in protein glycosylation in PMA-differentiated U-937 cells exposed to mineral particles. *Environ. Health Perspect.* **1997**, *105* (Suppl 5), 1153.
- (56) Klein, M. B.; Hayes, S. F.; Goodman, J. L. Monocytic differentiation inhibits infection and granulocytic differentiation potentiates infection by the agent of human granulocytic ehrlichiosis. *Infect. Immun.* **1998**, *66* (7), 3410–3415.
- (57) Gadhoom, S. Z.; Sackstein, R. CD15 expression in human myeloid cell differentiation is regulated by sialidase activity. *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4* (12), 751–757.
- (58) Semel, A. C. Hyposialylation of Integrins Stimulates the Activity of Myeloid Fibronectin Receptors. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (36), 32830–32836.
- (59) Seales, E. C.; Shaikh, F. M.; Woodard-Grice, A. V.; Aggarwal, P.; McBrayer, A. C.; Hennessy, K. M.; Bellis, S. L. A Protein Kinase C/Ras/ERK Signaling Pathway Activates Myeloid Fibronectin Receptors by Altering α 1 Integrin Sialylation. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (45), 37610–37615.
- (60) Liu, Z.; Swindall, A. F.; Kesterson, R. A.; Schoeb, T. R.; Bullard, D. C.; Bellis, S. L. ST6Gal-I regulates macrophage apoptosis via α 2-6 sialylation of the TNFR1 death receptor. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286* (45), 39654–39662.
- (61) Yang, H.-M.; Yu, C.; Yang, Z. N-acetylglucosaminyltransferase V negatively regulates integrin α 5 β 1-mediated monocyte adhesion and transmigration through vascular endothelium. *Int. J. Oncol.* **2012**, *41* (2), 589–598.
- (62) Cazet, A.; Lefebvre, J.; Adriaenssens, E.; Julien, S.; Bobowski, M.; Grigoriadis, A.; Tutt, A.; Tulasne, D.; Le Bourhis, X.; Delannoy, P. GD3 Synthase Expression Enhances

- Proliferation and Tumor Growth of MDA-MB-231 Breast Cancer Cells through c-Met Activation. *Mol. Cancer Res.* **2010**, 8 (11), 1526–1535.
- (63) Cross, A. S.; Hyun, S. W.; Miranda-Ribera, A.; Feng, C.; Liu, A.; Nguyen, C.; Zhang, L.; Luzina, I. G.; Atamas, S. P.; Twaddell, W. S.; *et al.* NEU1 and NEU3 sialidase activity expressed in human lung microvascular endothelia: NEU1 restrains endothelial cell migration, whereas NEU3 does not. *J. Biol. Chem.* **2012**, 287 (19), 15966–15980.
- (64) Groux-Degroote, S.; Krzewinski-Recchi, M.-A.; Cazet, A.; Vincent, A.; Lehoux, S.; Lafitte, J.-J.; Van Seuning, I.; Delannoy, P. IL-6 and IL-8 increase the expression of glycosyltransferases and sulfotransferases involved in the biosynthesis of sialylated and/or sulfated Lewisx epitopes in the human bronchial mucosa. *Biochem. J.* **2008**, 410 (1), 213–223.
- (65) García-Vallejo, J. J.; Van Dijk, W.; Van Het Hof, B.; Van Die, I.; Engelse, M. A.; Van Hinsbergh, V. W. M.; Gringhuis, S. I. Activation of human endothelial cells by tumor necrosis factor-alpha results in profound changes in the expression of glycosylation-related genes. *J. Cell. Physiol.* **2006**, 206 (1), 203–210.

Chapitre 2 : Etude structurale des variations de la glycosylation des macrophages, induites par *M. bovis* BCG et des composés mycobactériens

I – Introduction

Dans notre première partie, nous avons mis en évidence les variations structurales observées lors de la différenciation des cellules monocytaires THP-1 en macrophages, suite à l'incubation avec le PMA. Cela a permis de mettre en lumière le glycome des macrophages de manière précise mais également d'installer une méthodologie pour l'analyse de la glycosylation des cellules immunitaires. Les changements de glycosylation mis en évidence vont avoir un impact sur les interactions entre les glycanes exposés à la surface cellulaire et les lectines impliquées dans leur reconnaissance. Il peut aussi bien s'agir de lectines immunitaires, ou de lectines microbiennes impliquées dans les processus infectieux. De plus, les glycanes de la surface cellulaire peuvent également moduler l'adhésion des pathogènes en augmentant ou en diminuant la liaison de certaines lectines microbiennes aux cellules. Ainsi, il est possible que les bactéries puissent manipuler la glycosylation de l'hôte pour leur propre profit.

Cependant, il existe peu d'études sur les changements de glycosylation des macrophages infectés par des pathogènes intracellulaires ou activés par des composés pariétaux. Ces pathogènes envahissent les macrophages dans lesquels ils vont se multiplier et détourner les processus immunitaires, tels que la production de cytokines et des espèces radicalaires, la formation du phagolysosome ou encore l'apoptose cellulaire. En 2016, une étude de glycoprotéomique a démontré que lors de l'infection de macrophages THP-1 par *F. tularensis*, la production de *N*- et *O*-glycoprotéines était augmentée (Barel *et al.*, 2016). En début d'année, Hare *et al.* ont montré par des expériences de protéomique et de glycomique des variations du *N*-glycoprotéome des vésicules sécrétées par la même lignée macrophagique infectée par *M. tuberculosis* (Hare *et al.*, 2017). D'autres travaux ont montré que l'infection

par la souche virulente H37rv de *M. tuberculosis* induit une augmentation de fixation de la lectine ABA (Agaricus bisporus agglutinin) qui reconnaît les motifs Gal β 1,3Gal portés par les O-glycannes, notamment par le marqueur de surface CD44 (Tang *et al.*, 2017).

L'expression génétique des enzymes impliquées dans la machinerie de glycosylation, telles que la galactosyltransférase, la sialyltransférase, la neuraminidase ou la fucosidase, est modulée dans les macrophages exposés à *M. tuberculosis* (Kumar *et al.*, 2010; Kumar and Rao, 2011b; Silver *et al.*, 2009b). L'altération de la sialylation a également été détectée par HPLC dans des macrophages de souris activés par des glycolipides purifiés de la paroi cellulaire mycobactérienne, tels que le trehalose-dimycolate (Afroun *et al.*, 1988).

Néanmoins, malgré ces études, aucune modification de la structure des glycannes n'a été analysée, notamment en spectrométrie de masse, dans les macrophages infectés par *M. bovis BCG*. L'utilisation du modèle *M. bovis BCG* permet une manipulation peu contraignante contrairement à la souche *M. tuberculosis*, et partage une grande homologie de séquence avec cette dernière. Les cellules THP-1 sont communément utilisées comme modèle *in vitro* de monocytes et macrophages humains dans l'étude des pathologies inflammatoires et infectieuses. Dans de nombreuses études, cette lignée cellulaire est utilisée dans le but de décrypter les mécanismes mis en jeu lors des infections mycobactériennes (Chanput *et al.*, 2014; Mendoza-Coronel and Castañón-Arreola, 2016). La suite de nos travaux est de déterminer si une infection par *M. bovis BCG* induit des changements structuraux de la glycosylation sur cette lignée cellulaire. Nous avons également activé les macrophages avec un lipopeptide synthétique dérivé du fragment lipidique de la lipoprotéine de 19 kDa de *M. tuberculosis*, connu pour être un puissant activateur de la voie TLR2 des macrophages. Nous nous sommes intéressés aux profils de glycosphingolipides des macrophages infectés et activés, mais également à leurs profils de N-glycosylation. En parallèle, nous avons étendu notre étude à un second modèle cellulaire, les macrophages dérivés de monocytes de sang humain.

II – Résultats

A – Caractérisation phénotypique de l'activation des macrophages

Plusieurs travaux ont déjà démontré que les cellules THP-1 différenciées par le PMA et les macrophages dérivés des monocytes sanguins (MDM) présentent une activité phagocytaire similaire vis-à-vis de *M. bovis BCG* (Mendoza-Coronel and Castañón-Arreola, 2016; Riendeau and Kornfeld, 2003). Cette infection par *M. bovis BCG* conduit à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que le $\text{TNF}\alpha$, l'IL-1 β ou l'IL-12, mais également de marqueurs de surface cellulaire. Comme précédemment, les cellules THP-1 sont différenciées en macrophages par le PMA pendant 72h afin d'obtenir des cellules macrophagiques. Ces cellules sont ensuite infectées par *M. bovis BCG*. Avant de nous intéresser à la glycosylation des macrophages après infection, nous avons contrôlé l'état d'activation des cellules en mesurant par ELISA la sécrétion de $\text{TNF}\alpha$ et d'IL-1 β . Comme prévu, les niveaux de $\text{TNF}\alpha$ et IL-1 β produits par les THP-1 différenciées et les MDM infectés par *M. bovis BCG* sont significativement plus élevés par rapport aux cellules non traitées (Figure 53).

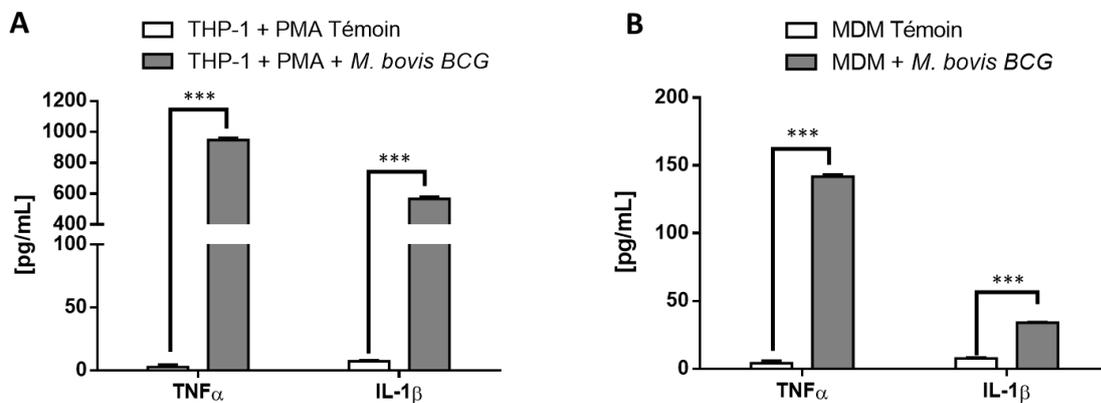


Figure 53 - Sécrétion des cytokines pro-inflammatoires par les cellules THP1 (A) et MDMs (B) après 24h d'infection par *M. bovis BCG*

Dosage ELISA du $\text{TNF}\alpha$ et de l'IL-1 β sécrétées par les macrophages infectés par *Mycobacterium bovis BCG*. Les données sont représentatives de trois expériences indépendantes en triplicate. Les moyennes et les écart-types sont calculés à partir d'un t-test effectué sur le logiciel GraphPad Prism 5 (***) ($p < 0.001$).

Ensuite, nous avons vérifié l'état d'activation des cellules en mesurant l'expression de certains antigènes de surface par cytométrie en flux, tels que des protéines co-stimulatrices (CD80, CD40) et une molécule d'adhésion (ICAM-1).

Plusieurs études ont montré que l'infection par *M. bovis BCG* ou *M. tuberculosis* induisait une surexpression de ces marqueurs au niveau des macrophages (Ordway *et al.*, 2006, 2005; Yoshida *et al.*, 2010).

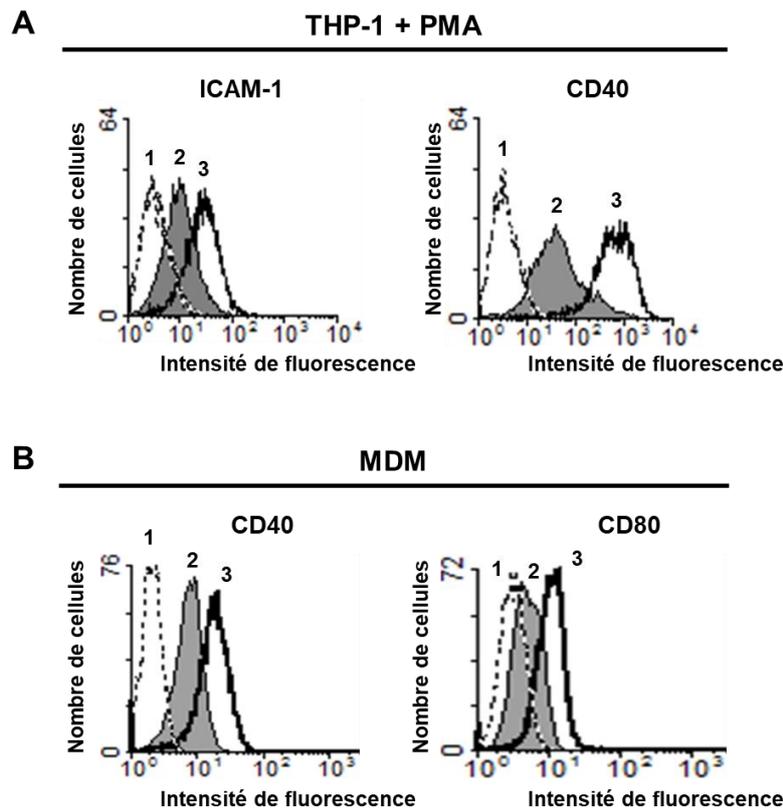


Figure 54 - Expression des marqueurs à la surface des macrophages après 48h d'infection par *M. bovis BCG*

Après 48h d'infection par *M. bovis BCG*, l'expression des marqueurs CD40 et ICAM-1 à la surface des cellules THP-1 (A) et l'expression des marqueurs CD40 et CD80 au niveau des MDM (B) sont analysées par cytométrie en flux. Ces résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes. 1 : Isotype contrôle ; 2 : Cellules témoins ; 3 : Cellules infectées par *M. bovis BCG*.

L'expression des antigènes CD40 et ICAM-1 est considérablement augmentée à la surface des macrophages THP-1 infectés par *M. bovis BCG* (Figure 54A). De même pour les MDM, les marqueurs CD40 et CD80 sont plus exprimés à la surface cellulaire des MDM traités par *M. bovis BCG* (Figure 54B).

De plus, les macrophages THP-1 et les MDM sont activés avec le lipopeptide synthétique PAM₃-LP₁₉, dérivé du fragment lipidique de la lipoprotéine de 19 kDa de *M. tuberculosis*, connu pour être un puissant activateur de la voie TLR2 des macrophages (Diaz-Silvestre *et al.*, 2005; Sánchez *et al.*, 2012; Schromm *et al.*, 2010). Comme attendu, nous avons constaté que l'activation par le PAM₃-LP₁₉ induit la sécrétion de TNF- α et IL1- β ainsi que l'expression de marqueurs de surface cellulaire des macrophages (Figure 55).

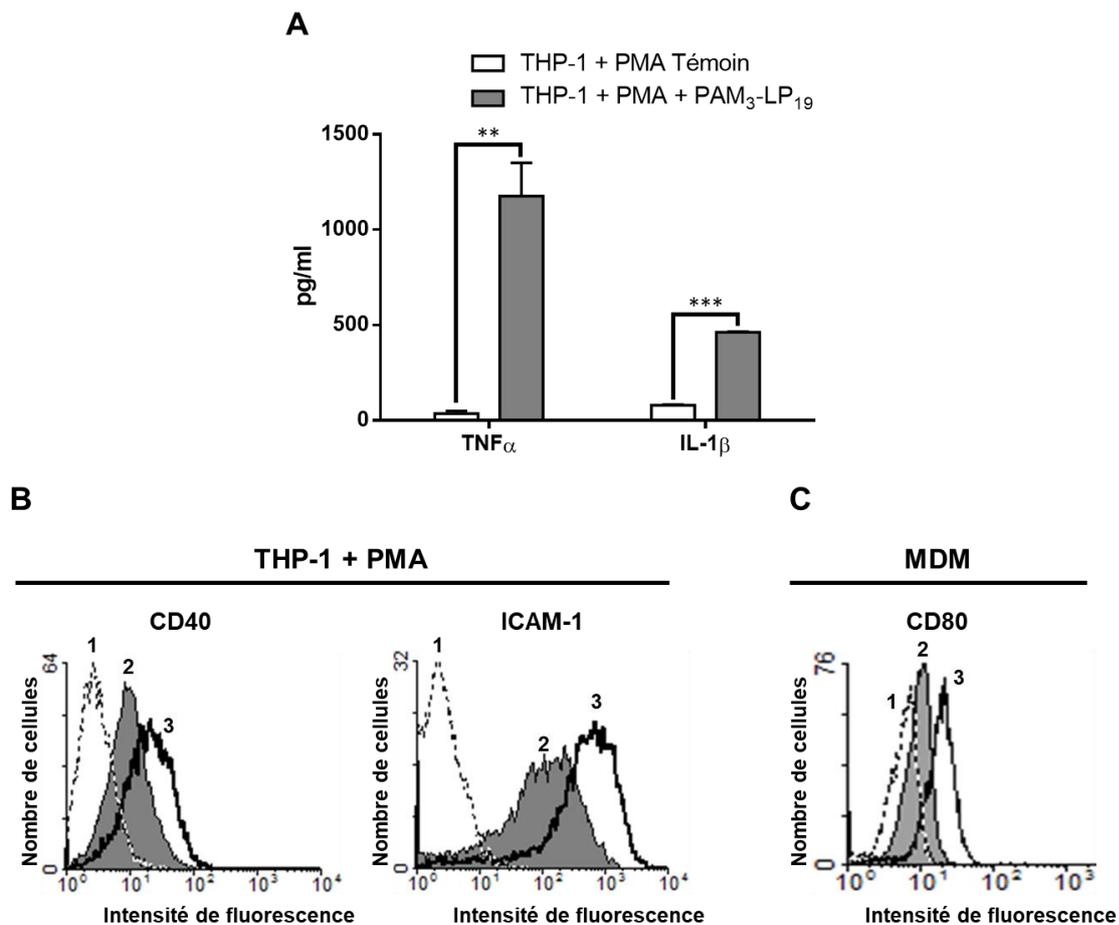


Figure 55 - Activation des macrophages après incubation par le PAM₃-LP₁₉

Dosage ELISA du TNF α et de l'IL-1 β sécrétées par les macrophages activés pendant 48h par le PAM₃-LP₁₉ (A) Les données sont représentatives de trois expériences indépendantes en triplicat. Les moyennes et les écart-types sont calculés à partir d'un t-test effectué sur le logiciel GraphPad Prism 5. (***) $p < 0.001$). Après 48 d'activation, l'expression des marqueurs CD40 et ICAM-1 au niveau des cellules THP-1 (B) et l'expression du CD80 au niveau des MDM (C) sont analysées par cytométrie en flux. Ces résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes. 1 : Isotype contrôle ; 2 : Cellules témoins ; 3 : Cellules activés par le PAM₃-LP₁₉

Dans l'ensemble, ces résultats indiquent que les macrophages (THP-1 + PMA et MDM) infectés par *M. bovis BCG* ou activés par le PAM₃-LP₁₉ présentent un phénotype pro-inflammatoire.

B – Analyses des profils de glycosphingolipides après infection des macrophages par *M. bovis* BCG

1 – Macrophages THP-1 PMA

Dans la première partie de nos travaux, nous avons observé pendant la différenciation des cellules THP-1 en macrophages, une nette augmentation de la synthèse des glycosphingolipides sialylés, et plus particulièrement des glycosphingolipides de la famille des gangliosides. En suivant le même protocole d'extraction des GSLs, les profils des cellules THP-1 différenciées et infectées par *M. bovis* BCG, ont été analysés en spectrométrie de masse. Contrairement à la différenciation, l'infection mycobactérienne n'influence pas la composition en GSLs des macrophages (Figure 56).

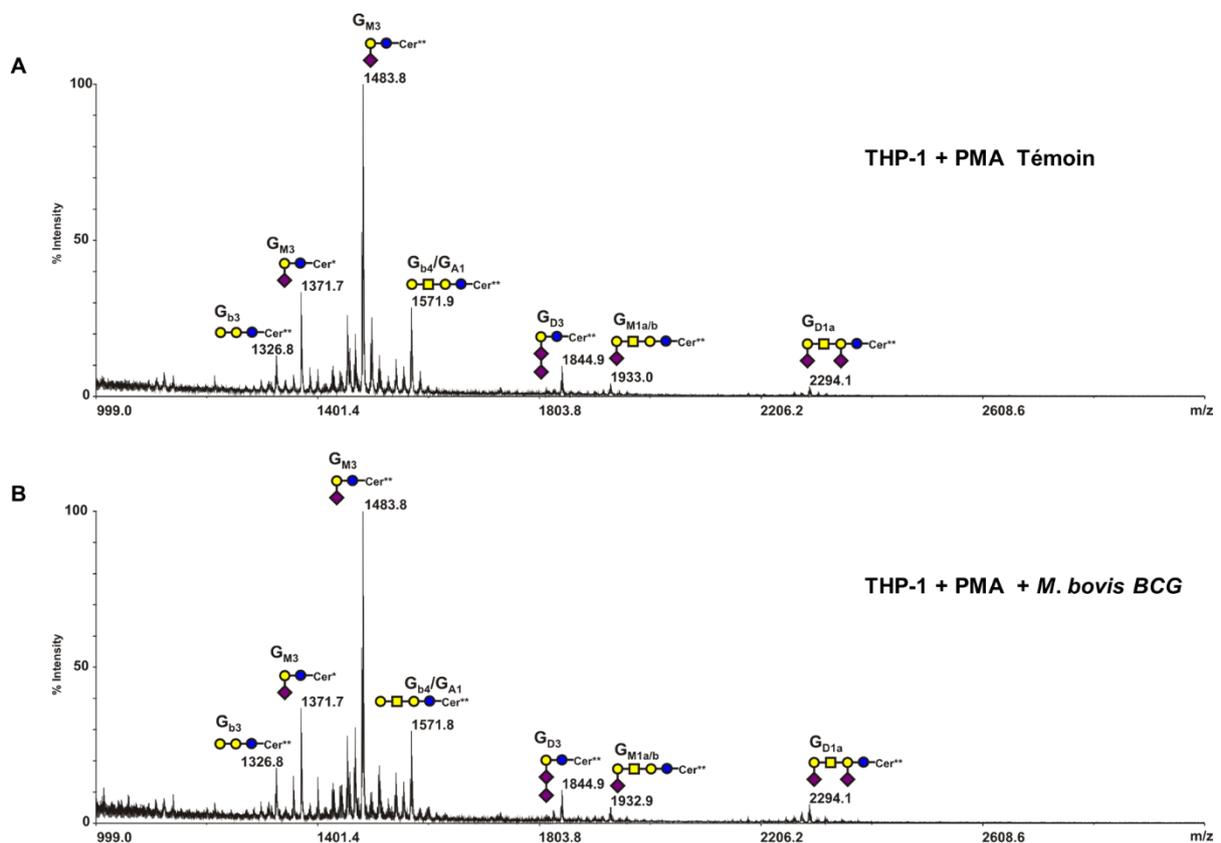


Figure 56 - Spectre de masse MALDI-TOF représentatif des GSLs perméthylés des cellules THP-1 différenciées témoins (A) et infectées par *M. bovis* BCG (B)

La nature des glycanes a été déterminée par l'analyse MS/MS, comme décrit ci-dessous. (Cer* : d18:1/C16:0; Cer** : d18:1/C24:0). Ces résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes.

Les macrophages présentent quelques structures neutres de type globosides, comme le Gb3 et le Gb4, mais arborent principalement des GSLs de type ganglioside. Le ganglioside GM3 est la structure majoritaire, mais on détecte également d'autres structures mono-sialylées comme et le GM1, ou di-sialylées comme le GD3 et le GD1a. De plus, les différents glycolipides ont la même composition en céramides après infection avec principalement les céramides [d18:1 - C16:0 (Cer*)] et [d18:1 - C24:0 (Cer**)].

Les macrophages THP-1 sont ensuite activés par le lipopeptide synthétique PAM₃-LP₁₉, activateur de la voie TLR2. Comme pour l'infection avec *M. bovis BCG*, l'activation des macrophages ne modifie pas la composition globale des macrophages en GSLs (Figure 57 ; Figure 58). Ce résultat est prévisible car l'infection mycobactérienne active de nombreuses voies, dont la voie TLR2.

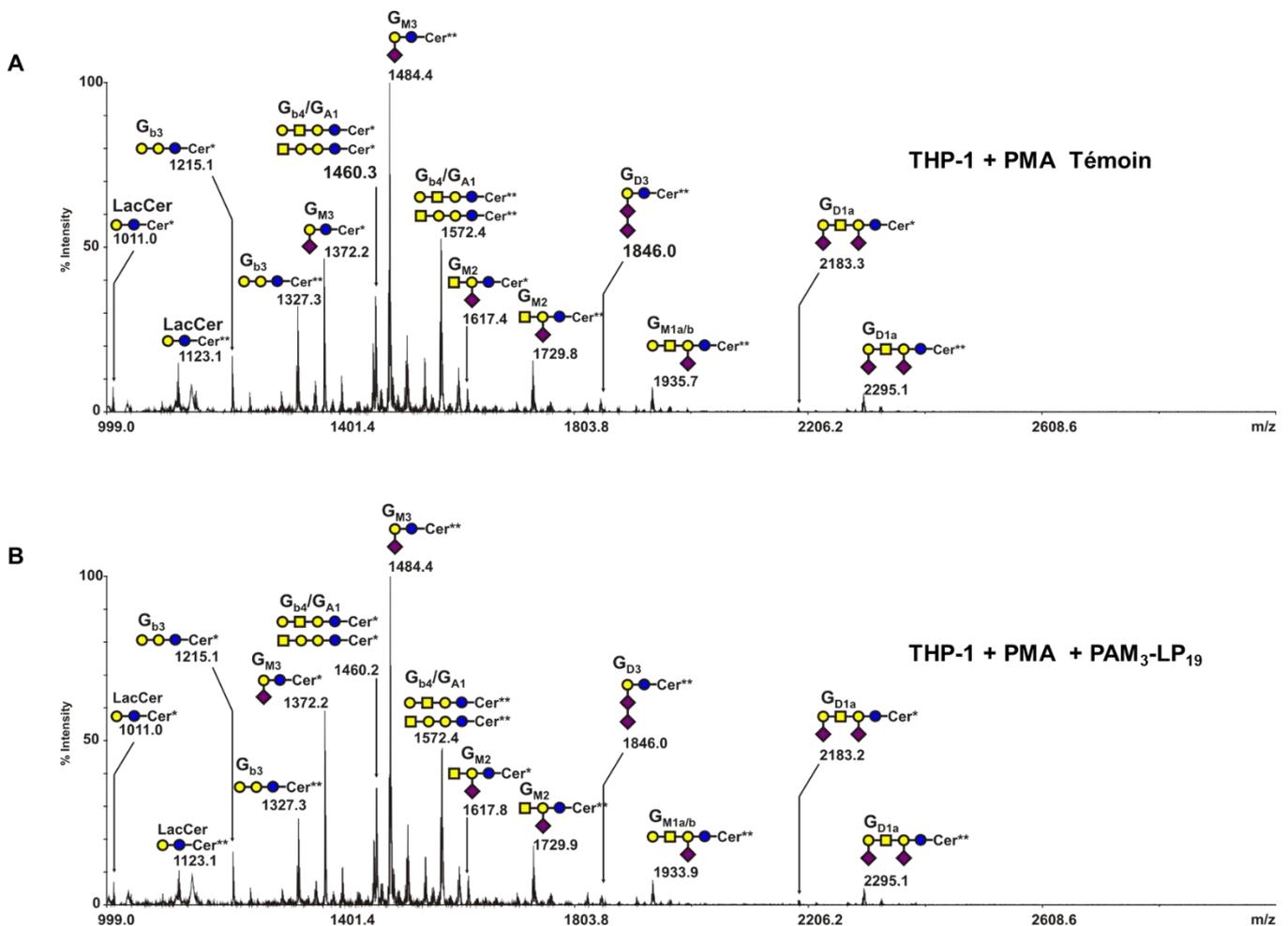


Figure 57 - Spectre de masse MALDI-TOF représentatif des GSLs perméthylés des cellules THP-1 différenciées témoins (A) et activées par le lipopeptide synthétique PAM₃-LP₁₉ (B)
 La nature des glycannes a été déterminée par l'analyse MS/MS, comme décrit ci-dessous. (Cer* : d18:1/C16:0 ; Cer** : d18:1/C24:0)

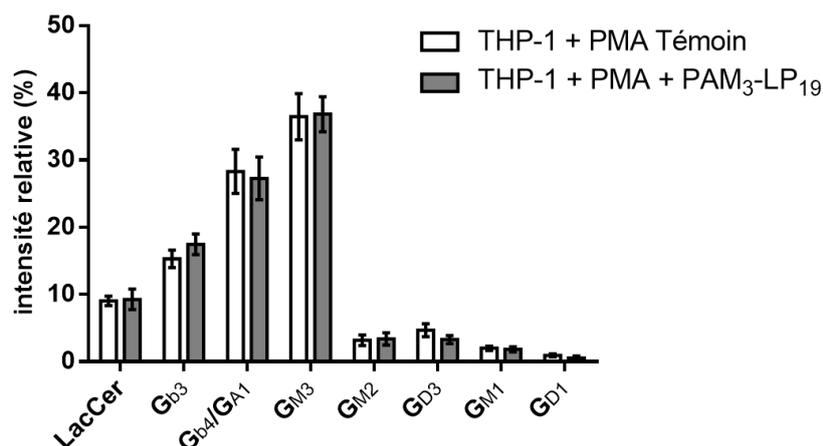


Figure 58 - Composition en glycosphingolipides perméthylés isolés à partir de cellules THP-1 différenciées témoins et activées par le lipopeptide synthétique PAM₃-LP₁₉.

Les données sont représentatives de trois expériences indépendantes. Les moyennes et les écart-types sont calculés à partir d'un test ANOVA effectué sur le logiciel GraphPad Prism 5.

2 – Macrophages dérivés de monocytes sanguins

Les monocytes CD14⁺ isolés à partir de sang humain sont différenciés en macrophages pendant 6 jours en présence de GM-CSF. Une fois différenciés, les MDM sont soit infectés *M. bovis BCG*, soit activés par le lipopeptide synthétique PAM₃-LP₁₉. Comme pour les macrophages des cellules THP-1, les GSLs sont extraits par différentes proportions de solvants organiques, purifiés et perméthylés avant d'être analysés.

La première observation est que le profil de GSLs des MDM est beaucoup moins complexe que celui observé au sein de macrophages obtenus à partir de la lignée cellulaire THP-1. En effet, on observe principalement (>90%) du GM3, lié au [d18:1 - C16:0 (Cer*)] et [d18:1 - C24:1 (Cer**)] (Figure 59A). On note également des traces de gangliosides de type M1 au niveau de certains lots de MDM, mais toujours dans des proportions faibles.

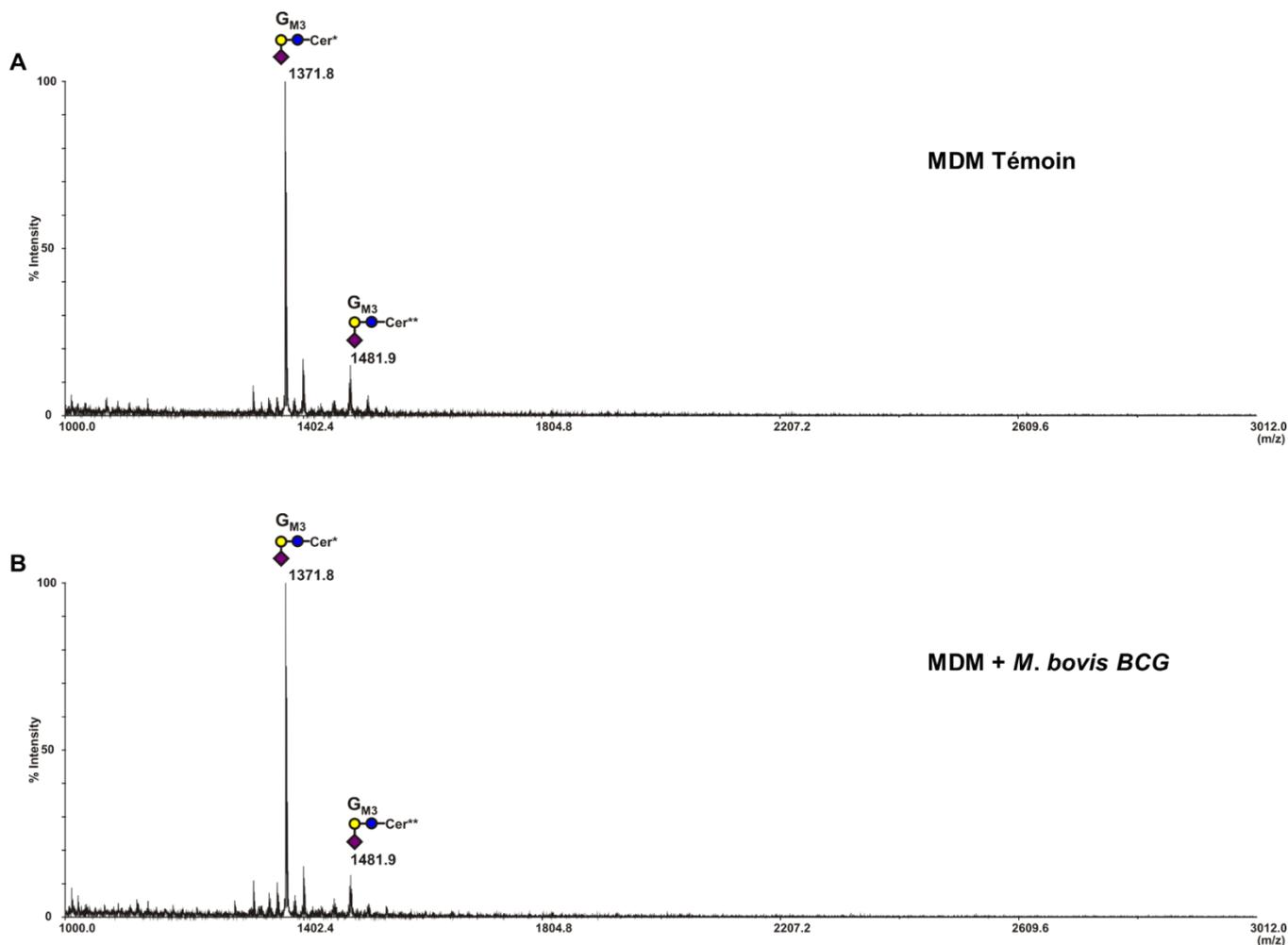


Figure 59 - Spectre de masse MALDI-TOF représentatif des GSLs perméthylés des MDM témoins (A) et infectées par *M. bovis* BCG (B)

La nature des glycanes a été déterminée par l'analyse MS/MS, comme décrit ci-dessous. (Cer* : d18:1/C16:0 ; Cer** : d18:1/C24:0). Ces résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes.

Cependant, l'infection par *M. bovis* BCG et l'activation par le PAM₃-LP19 n'induisent aucun changement des profils de GSLs (Figure 59B et Figure 60B). Ces résultats sont en corrélation avec ceux obtenus avec la lignée THP-1.

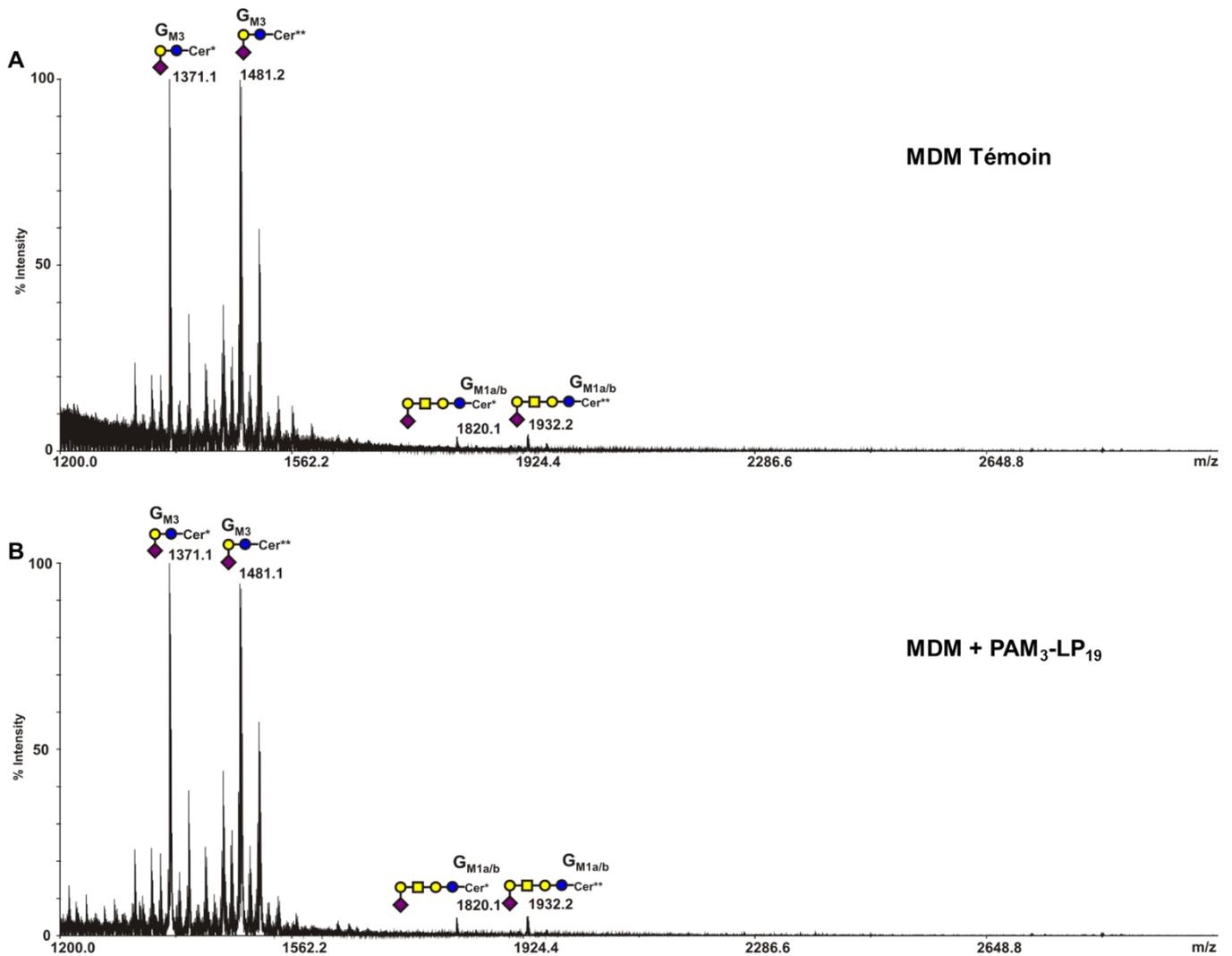


Figure 60 - Spectre de masse MALDI-TOF représentatif des GSLs perméthylés des MDM témoins (A) et activées par le lipopeptide synthétique PAM3-LP19 (B)

La nature des glycanes a été déterminée par l'analyse MS/MS, comme décrit ci-dessous. (Cer* : d18:1/C16:0; Cer** : d18:1/C24:0). Ces résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes.

C – Analyses des profils de *N*-glycosylation après infection des macrophages par *M. bovis* BCG

1 – Macrophages THP-1 PMA

Dans le cadre de l'étude de la *N*-glycosylation des macrophages primaires, nous avons été confrontés à des problèmes de préparation d'échantillons car les protocoles précédents nécessitent un nombre important de cellules pour l'analyse du glycome des cellules. Pour cette partie de nos travaux, nous avons mis en place un protocole basé sur l'extraction au

Triton X-100 des protéines. Les protéines extraites et dénaturées sont ensuite *N*-déglycosylées par traitement à la PNGase F. Les *N*-glycannes libérés par la PNGase F sont purifiés sur cartouche de C18 en phase inverse, perméthylés et mesurés en spectrométrie de masse.

Dans la première partie de nos travaux, le *N*-glycome des cellules THP-1 différenciées a été détaillé (cf Figure 45). Les *N*-glycannes de type oligomannosidique représentent au minimum près de 40% de l'ensemble des structures glycanniques, tandis que le reste des *N*-glycannes sont de type complexe avec des degrés plus ou moins importants de ramification, sialylation et fucosylation. Après infection par *M. bovis BCG*, les macrophages THP-1 ne présentent pas de variations significatives du taux de *N*-glycannes de type oligomannosidique et complexe (Figure 61A), ni du taux de sialylation (Figure 61D).

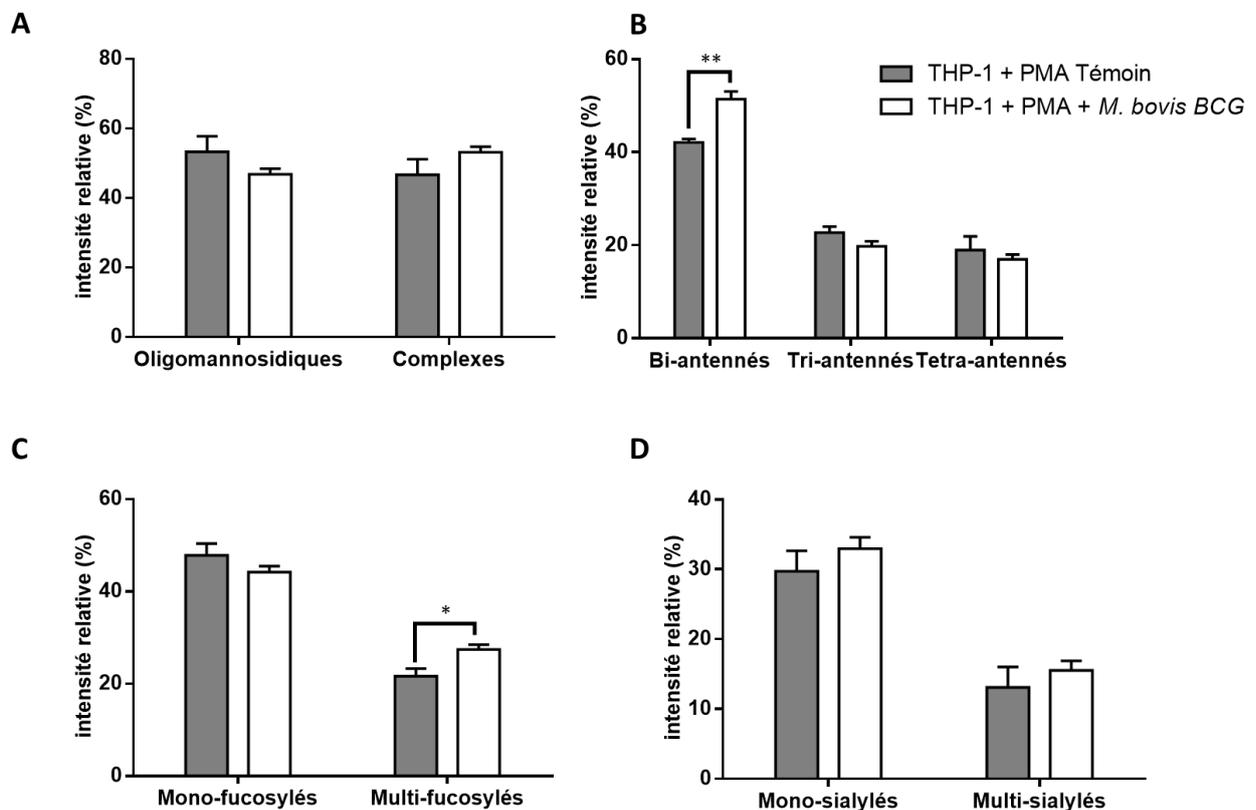


Figure 61 - Modifications structurales des profils MS des *N*-glycannes perméthylés des cellules THP-1 différenciées infectées par *M. bovis BCG*.

Taux de *N*-glycannes de type oligomannosidique et complexe (A); niveaux d'antennarisation des *N*-glycannes complexes (B); taux de fucosylation des *N*-glycannes de type complexe (C); taux de sialylation des *N*-glycannes de type complexe (D). Les données sont représentatives de quatre expériences indépendantes. Les moyennes et les écart-types sont calculés à partir d'un test ANOVA effectué sur le logiciel GraphPad Prism 5 (** $p < 0.01$; * $p < 0.05$).

Par contre, l'infection par *M. bovis BCG* induit des modifications structurales des niveaux de fucosylation et du degré d'antennarisation (Figure 61B et C). En effet, les structures multifucosylées sont plus abondantes suite à l'infection, augmentant de 21 à 27% de l'ensemble des *N*-glycannes (Figure 61C). De même pour les structures bi-antennées, leur taux passe de 42 à 51% suite à l'infection (Figure 61B).

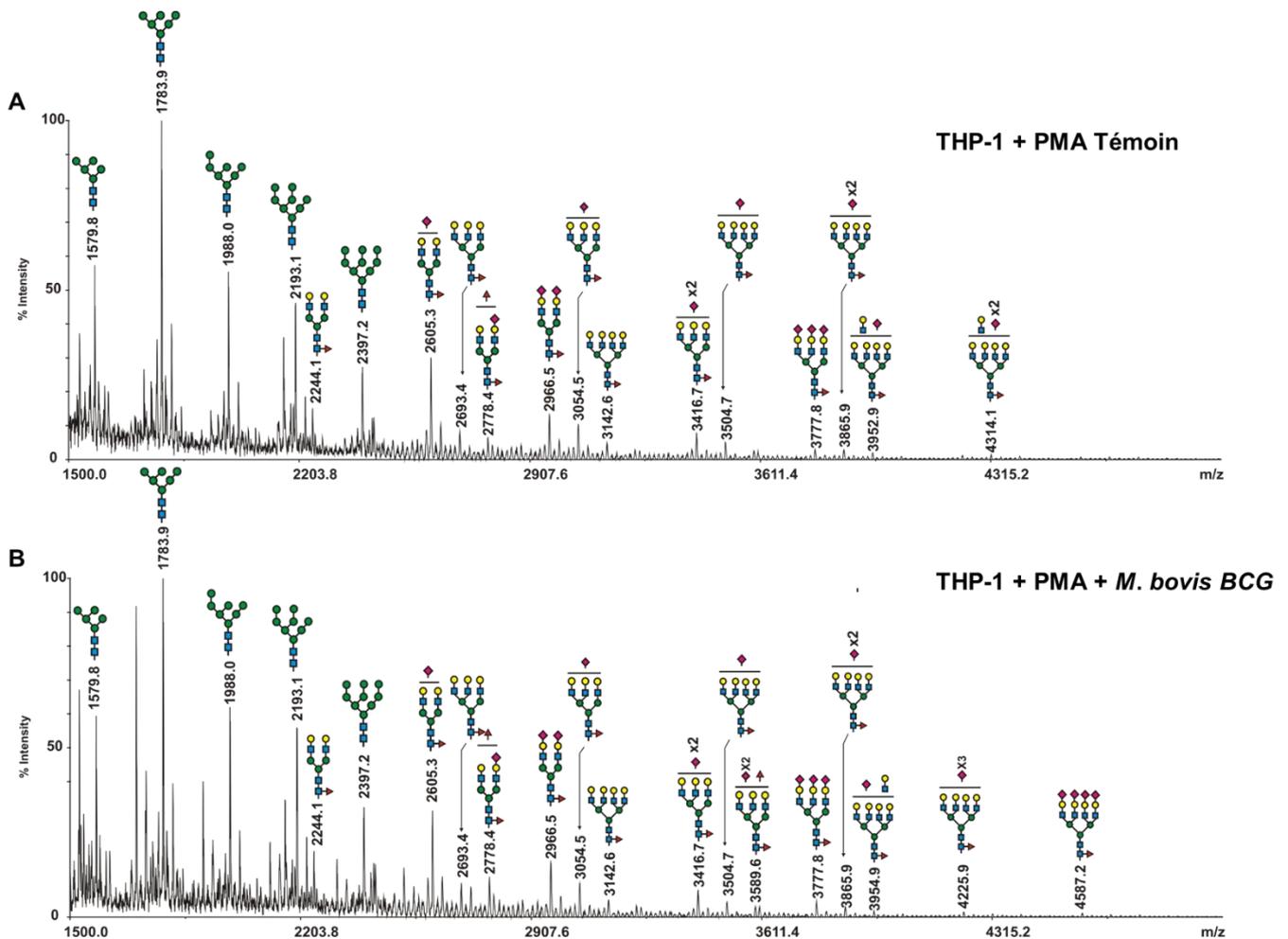


Figure 62 - Spectre de masse MALDI-TOF représentatif des *N*-glycannes perméthylés de Macrophages THP-1 (A) et infectés par *M. bovis BCG* (B).

Après incubation avec le lipopeptide PAM₃-LP₁₉, les cellules THP-1 PMA présentent des différences de la *N*-glycosylation totale. La proportion de *N*-glycannes oligomannosidiques diminue, équilibrée par une augmentation des *N*-glycannes de type complexe. Les *N*-glycannes de type complexe représentent 50% de l'ensemble du *N*-glycome avant infection, et passe à un taux de 60% après exposition à *M. bovis BCG* (Figure 63A). Cette hausse des *N*-glycannes de type complexe conduit également à une augmentation des différentes modifications, telles que la sialylation et la fucosylation. On peut noter une hausse des

structures mono-sialylées et multi-sialylées dans leur ensemble, et plus intéressant, comme pour l'infection par *M. bovis BCG*, les structures multi-fucosylées et di-antennées sont également plus abondantes après activation par le lipopeptide PAM₃-LP₁₉ (Figure 63).

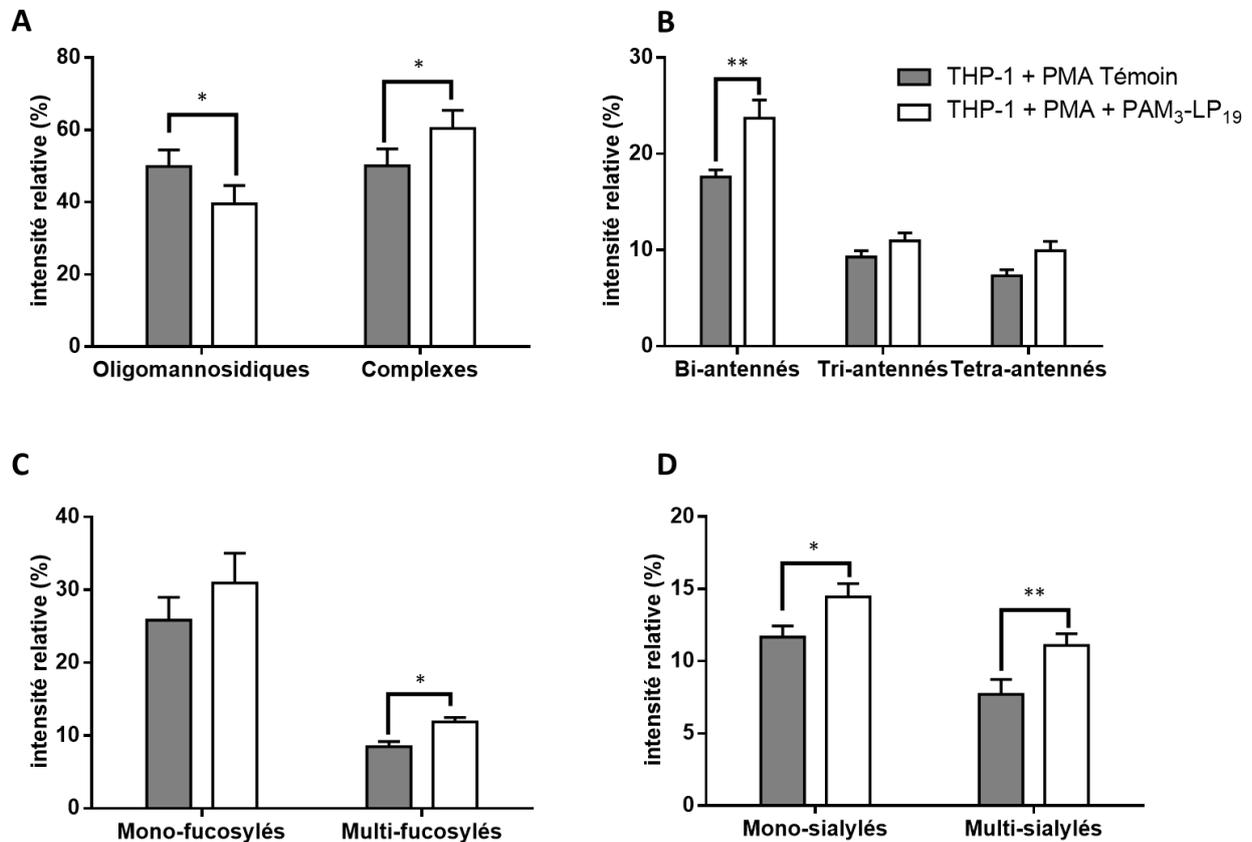


Figure 63 - Modifications structurales des profils MS des *N*-glycannes perméthylés des cellules THP-1 différenciées activées par le lipopeptide synthétique PAM₃-LP₁₉.

Taux de *N*-glycannes de types oligomannosidique et complexes (A); niveaux d'antennarisation des *N*-glycannes totaux (B); taux de fucosylation des *N*-glycannes totaux (C); taux de sialylation des *N*-glycannes totaux (D). Les données sont représentatives de quatre expériences indépendantes. Les moyennes et les écart-types sont calculés à partir d'un test ANOVA effectué sur le logiciel GraphPad Prism 5 (** $p < 0.01$; * $p < 0.05$).

Cependant, si on ne prend en compte que les *N*-glycannes de type complexe, l'augmentation des taux de sialylation et de fucosylation n'est plus significative (Figure 64A et Figure 64B). Cela nous indique que les hausses de fucosylation et de sialylation précédemment observées sont dépendantes de l'accroissement des *N*-glycannes de type complexe. Par contre, l'augmentation des *N*-glycannes bi-antennés est confirmée, car on retrouve une élévation du taux de *N*-glycannes bi-antennés parmi les glycannes de type complexe.

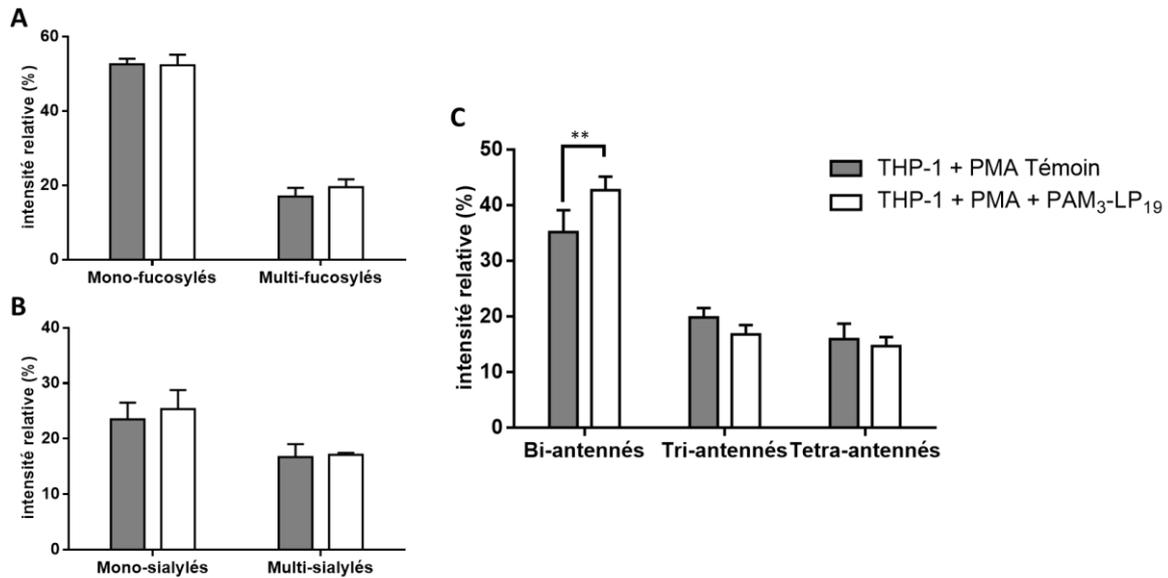


Figure 64 - Modifications structurales des profils MS des *N*-glycannes de type complexe perméthylés des cellules THP-1 différenciées activées par le lipopeptide synthétique PAM₃-LP₁₉.

Taux de fucosylation des *N*-glycannes complexes (A); taux de sialylation des *N*-glycannes complexes (B) ; Niveaux d'antennarisation des *N*-glycannes complexes (C). Les données sont représentatives de quatre expériences indépendantes. Les moyennes et les écart-types sont calculés à partir d'un test ANOVA effectué sur le logiciel GraphPad Prism 5 (**p<0.01).

Cette augmentation du taux de *N*-glycannes complexes bi-antennés est donc retrouvée après infection par *M. bovis BCG* et activation par le PAM₃-LP₁₉. On peut donc avancer que cette variation structurale observée lors de l'infection mycobactérienne est dépendante de la voie TLR2. Pour confirmer nos résultats, nous sommes passés au second modèle cellulaire, les macrophages issus de la différenciation de monocytes de sang humain.

2 – Macrophages dérivés de monocytes sanguins

Afin de déterminer le *N*-glycome de ce second modèle cellulaire, nous avons suivi le même protocole de libération des *N*-glycannes, basé sur une extraction des protéines par le Triton X-100. La Figure 65A nous montre le profil de *N*-glycosylation des MDM non-infectés.

Les macrophages humains présentent des profils de *N*-glycosylation semblables à ceux des cellules THP-1. Les *N*-glycannes de type oligomannosidique représentent la moitié de l'ensemble des structures glycaniques détectées. L'autre moitié est constituée de *N*-glycannes de type complexe présentant des niveaux d'antennarisation, de sialylation et de fucosylation variables.

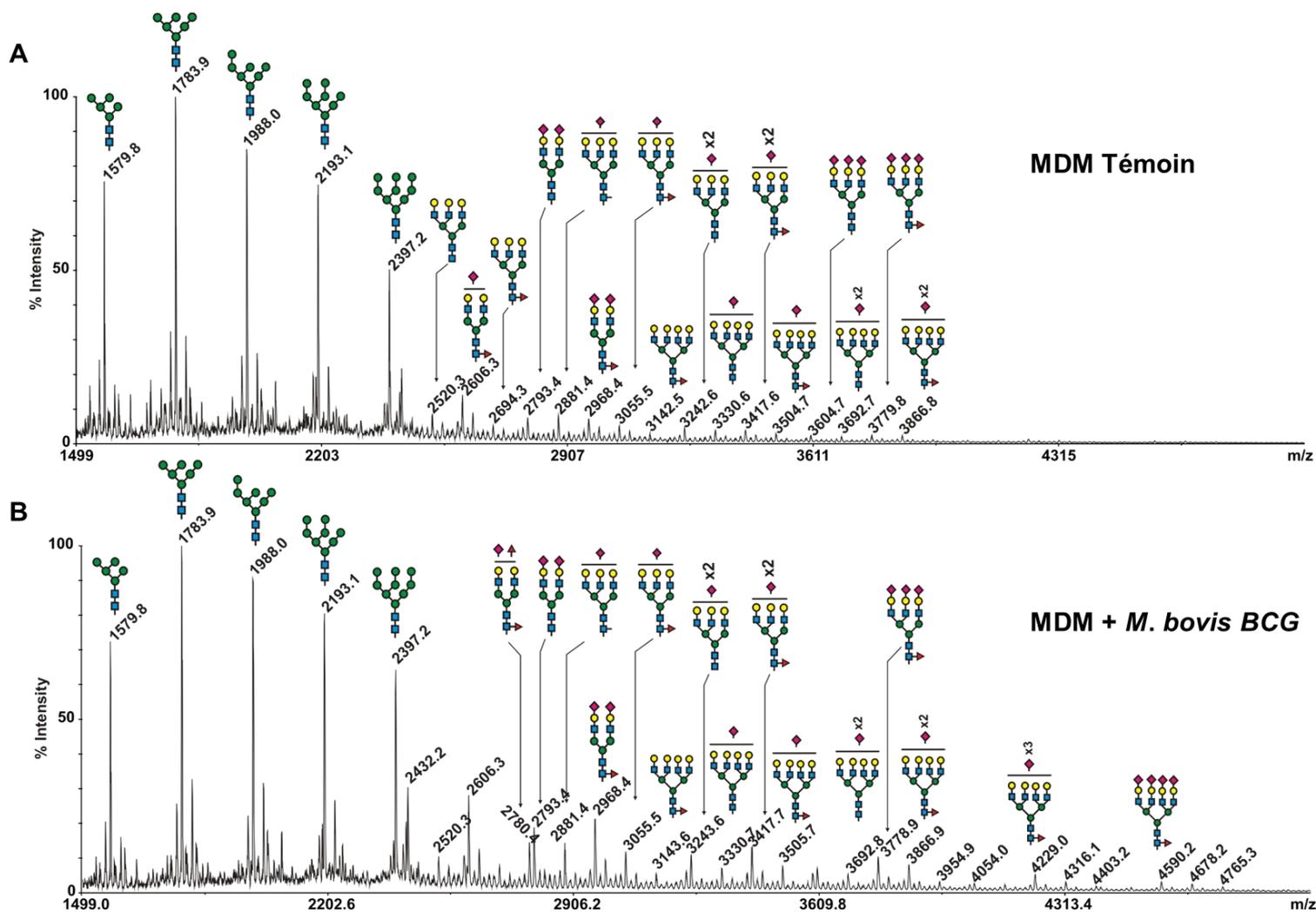


Figure 65 - Spectre de masse MALDI-TOF représentatif des *N*-glycannes perméthylés de Macrophages humains dérivés de monocytes sanguins témoins (A) et infectés par *M. bovis* BCG (B).

Après l'infection des MDM par *M. bovis* BCG, les données des spectres de *N*-glycannes obtenus (Figure 65B) ont été comparées aux cellules contrôles (Figure 65A). Nos résultats indiquent une augmentation du taux de *N*-glycannes bi-antennés après infection, comme nous avons pu le voir avec la lignée THP-1. Comme pour les cellules THP-1, l'infection des macrophages humains induit une augmentation du taux de structures fucosylées (Figure 66).

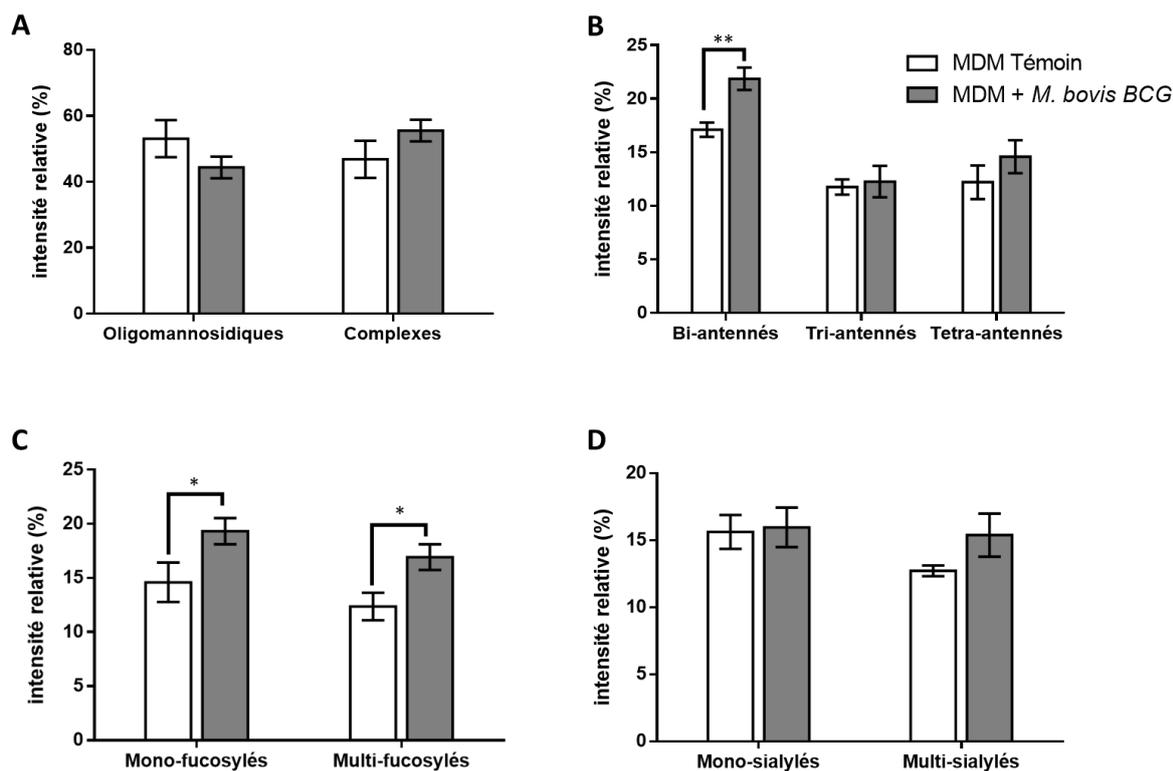


Figure 66 - Modifications structurales des profils MS des *N*-glycannes perméthylés des macrophages humains infectés par *M. bovis* BCG.

Taux de *N*-glycannes de types oligomannosidique et complexe (A); niveaux d'antennarisation des *N*-glycannes complexes (B); taux de fucosylation des *N*-glycannes (C) ; taux de sialylation des *N*-glycannes (D). Les données sont représentatives de trois expériences indépendantes. Les moyennes et les écart-types sont calculés à partir d'un test ANOVA effectué sur le logiciel GraphPad Prism 5 (** $p < 0.01$; * $p < 0.05$).

D - Détection des épitopes glucidiques à la surface des macrophages

Nos résultats obtenus par spectrométrie de masse ont révélé que l'infection des cellules THP-1 différenciées par *M. bovis* BCG et l'activation par le PAM₃-LP₁₉ induisent une faible augmentation mais néanmoins significative de la fucosylation et de l'antennarisation des *N*-glycannes complexes. De plus, la sialylation est légèrement affectée par la stimulation avec le PAM₃-LP₁₉ alors qu'aucun effet n'a été détecté lors de l'infection par *M. bovis* BCG. Pour déterminer si l'expression de certains épitopes glucidiques à la surface cellulaire est modulée lors de l'activation cellulaire, nous avons étudié la fixation de lectines végétales fluorescentes par cytométrie en flux (Tableau 8).

Lectine	Source	Affinité
LTA	<i>Lotus tetragonolobus</i>	α 1,3Fucose > α 1,2Fucose
UEA-I	<i>Ulex europaeus</i>	α 1,2Fucose
SNA	<i>Sambucus nigra</i>	α 2,6Neu5Ac
MAA-I	<i>Maackia amurensis</i>	α 2,3Neu5Ac
PHA-L	<i>Phaseolus vulgaris</i>	β 1,6GlcNAc (<i>N</i> -glycannes tri- et tétra-antennés)

Tableau 8 - Lectines végétales fluorescentes utilisées

La LTA interagit de manière préférentielle avec le L-fucose lié en α 1,3 et avec une plus faible affinité pour le L-fucose lié en α 1,2 (Yan *et al.*, 1997). Contrairement à la LTA, la UEA-I est une lectine spécifique du L-fucose lié en α 1,2 (Baldus *et al.*, 1996). La SNA reconnaît spécifiquement les résidus terminaux de Neu5Ac en α 2,6 tandis que la MAA-I se lie à Neu5Ac en α 2,3) (Geisler and Jarvis, 2011; Shibuya *et al.*, 1987). La PHA-L présente une spécificité pour les résidus de *N*-acétyl-glucosamine et en particulier pour les *N*-glycannes de type complexe tri et tétra-antennés (Schwarz *et al.*, 1996). Comme l'illustre la figure suivante, les cellules THP-1 présentent une intensité de fluorescence deux fois plus importante après infection par *M. bovis BCG* (Figure 67).

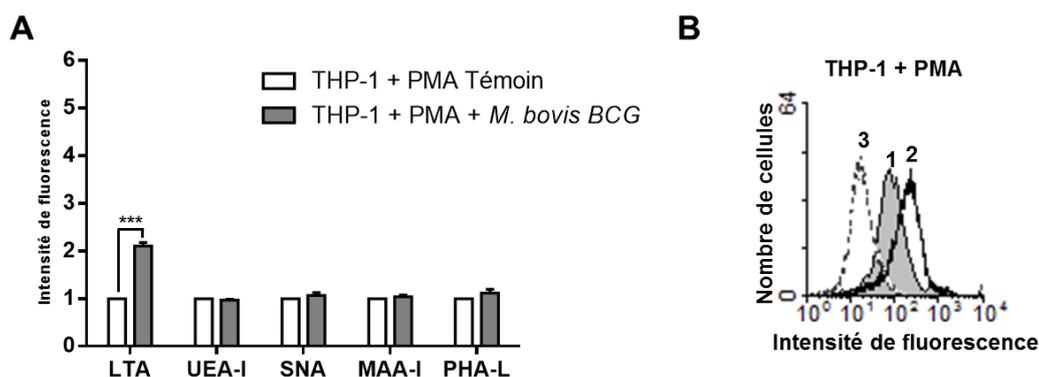


Figure 67 - Fixation des lectines végétales fluorescentes sur les cellules THP-1 infectées par *M. bovis BCG*

Comparaison de la fixation des différentes lectines végétales (A) dont la LTA (B) à la surface des cellules THP-1 après infection par *M. bovis BCG*. 1 : Cellules témoins ; 2 : Cellules infectées par *M. bovis BCG* ; 3 : Cellules infectées par *M. bovis BCG* + L-Fucose. Les données sont représentatives de trois expériences indépendantes. Les moyennes et les écart-types sont calculés à partir d'un test ANOVA effectué sur le logiciel GraphPad Prism 5 (***) $p < 0.001$.

Concernant les autres lectines, il n'y a pas de variation significative de leur fixation à la surface cellulaire après infection. Une augmentation de la fixation de la LTA suggère une augmentation de la fucosylation soit en $\alpha 1,3$ ou soit en $\alpha 1,2$. Cependant, aucune variation de fixation de la UEA-I n'est détectée, ce qui implique qu'aucune augmentation de la fucosylation en $\alpha 1,2$ n'a lieu. Nous pouvons donc conclure que l'augmentation de la fixation de la LTA après infection par *M. bovis BCG* est dépendante d'une augmentation de la fucosylation en $\alpha 1,3$. Cette hausse de fixation de LTA est bien dépendante de la fucosylation car lorsque la LTA est pré-incubée avec un excès de L-Fucose, la fixation de la lectine sur les cellules est fortement inhibée. Après activation par le PAM₃-LP₁₉, une légère augmentation néanmoins significative également de la LTA est détectée mais moindre que celle observée après infection (Figure 68).

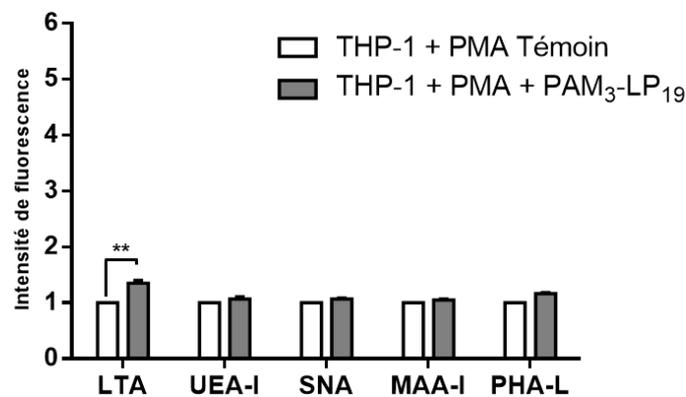


Figure 68 - Fixation des lectines végétales fluorescentes sur les cellules THP-1 activées par le lipopeptide synthétique PAM₃-LP₁₉.

Comparaison de la fixation des différentes lectines végétales à la surface des cellules THP-1. Les données sont représentatives de trois expériences indépendantes. Les moyennes et les écart-types sont calculés à partir d'un test ANOVA effectué sur le logiciel GraphPad Prism 5 (**p<0.01).

Des expériences similaires ont été effectuées ensuite sur les MDM, et comme pour les cellules THP-1, les macrophages humains sont plus sensibles à la fixation de la LTA après infection par *M. bovis BCG* (Figure 69).

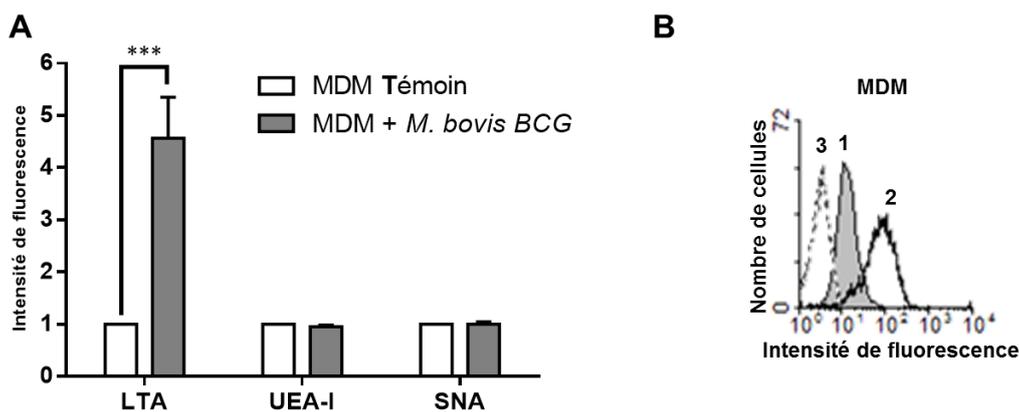


Figure 69 - Fixation des lectines végétales fluorescentes sur les macrophages humains infectés par *M. bovis* BCG

Comparaison de la fixation des différentes lectines végétales (A) dont la LTA (B) à la surface des MDM après infection par *M. bovis* BCG. 1 : Cellules témoins ; 2 : Cellules infectées par *M. bovis* BCG ; 3 : Cellules infectées par *M. bovis* BCG + L-Fucose. Les données sont représentatives de trois expériences indépendantes. Les moyennes et les écart-types sont calculés à partir d'un test ANOVA effectué sur le logiciel GraphPad Prism 5 (**p<0.001).

On note une augmentation de la fixation de la LTA 4,5 fois plus importante, alors qu'elle n'était que deux fois plus importante pour les cellules THP-1-PMA infectées. En revanche la fixation de la UEA-1 est similaire à la surface des MDM infectés ou non-stimulés, ce qui confirme une nouvelle fois l'élévation du taux de fucosylation en α 1,3. De plus, on observe à nouveau une perte de la fixation de la LTA lorsque celle-ci est incubée avec du fucose.

L'augmentation de la fucosylation en α 1,3 peut être associée à une augmentation des épitopes de type Lewis X. Comme dans le chapitre précédent, nous avons mesuré l'expression des épitopes Lewis X et Sialyl Lewis X par cytométrie en flux à l'aide d'anticorps spécifiques.

La Figure 70 montre que l'infection par *M. bovis* BCG n'induit aucune variation de la fixation des anticorps anti-CD15 et anti-sCD15. Après activation par le PAM₃-LP₁₉, on ne détecte également aucun changement de la fixation des anticorps anti-CD15 et sCD15.

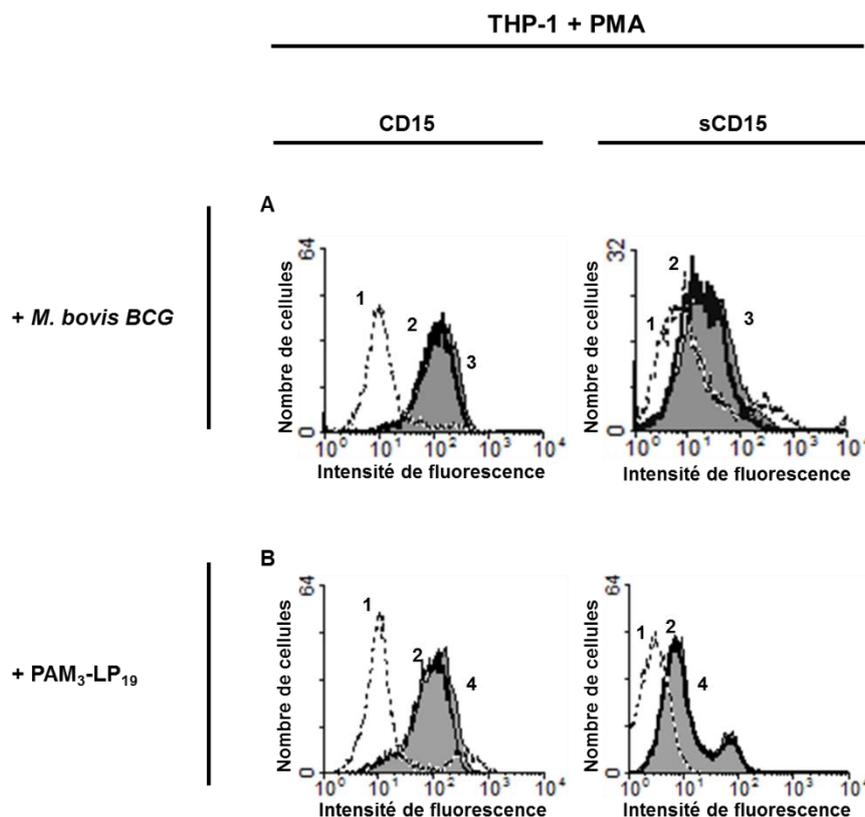


Figure 70 - Détection des épitopes Lewis X et Sialyl Lewis X à la surface des cellules THP-1 infectées par *M. bovis BCG* (A) et activées par le lipopeptide synthétique PAM₃-LP₁₉ (B). L'expression des épitopes Lewis X (CD15) et Sialyl Lewis X (sCD15) au niveau des cellules THP-1 après 48 d'infection par *M. bovis BCG* (A) ou d'activation par le lipopeptide synthétique PAM₃-LP₁₉ (B) est analysée par cytométrie en flux à l'aide d'anticorps fluorescents. Ces résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes. 1 : Isotype contrôle ; 2 : Cellules témoins ; 3 : Cellules infectées par *M. bovis BCG* ; 4 : Cellules activées par le PAM₃-LP₁₉.

E – Expression des différentes fucosyltransférases

Nous avons voulu ensuite déterminer les enzymes responsables de ces variations de fucosylation. Comme nous avons constaté une augmentation de fixation de la LTA, nous nous sommes concentrés sur l'expression de différentes α 1,3-fucosyltransférases (*FUT3*, *FUT4*, *FUT6*, *FUT7* et *FUT9*), et l'expression de la α 1,6-fucosyltransférase *FUT8*. Nous avons étudié l'expression des ARNm des macrophages THP-1 après infection par *M. bovis BCG*.

Les analyses en qPCR nous indiquent que les ARNm des α 1,3-fucosyltransférases *FUT3*, *FUT6* et *FUT9* ne sont pas exprimés au niveau des macrophages THP-1. Après 24h d'infection par *M. bovis BCG*, les ARNm des α 1,3-fucosyltransférases *FUT4* et *FUT7* sont sous-exprimés, tout comme ceux de la α 1,6-fucosyltransférase *FUT8* (Figure 71).

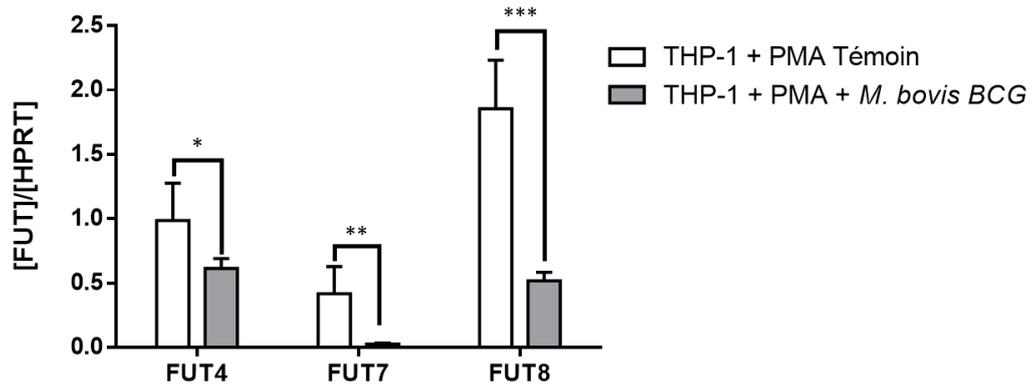


Figure 71 - Expression des ARNm des fucosyltransférases des cellules THP-1 infectées par *M. bovis* BCG

Les ARN totaux sont extraits des cellules indifférenciées et des cellules THP-1 différenciées par PMA et les ARNm sont quantifiés par RT-qPCR par la méthode décrite par Pfaffl et normalisée avec le gène HPRT (Pfaffl, 2001). Les données représentent la déviation standard de trois réplicats à partir de trois expériences indépendantes.

III – Discussion

Dans les années 80, une étude avait démontré des différences dans la composition en gangliosides des tissus de tatous infectés par *M. leprae* (Harris *et al.*, 1986). Cette infection non-tuberculeuse induit une augmentation de la production de gangliosides mono-sialylés de type GM1, GM2 et GM3. Contrairement à *M. leprae*, l'infection, *in vitro* des macrophages humains, par *M. bovis BCG* ne provoque pas de variation des profils de glycosphingolipides que ce soit au niveau des macrophages THP-1 et des macrophages dérivés des monocytes de sang. L'augmentation de fucosylation observée après infection par *M. bovis BCG* n'est donc pas liée à une augmentation de la fucosylation des glycolipides de l'hôte. En effet, aucun résidu de fucose n'a été détecté en spectrométrie de masse. Il semblerait donc que les glycosphingolipides ne joueraient pas de rôle dans les taux fucosylation. Par contre, ce taux accru de fucosylation membranaire est corrélée à une augmentation de la fucosylation des *N*-glycannes sur nos différents modèles cellulaires. Cette hausse de la fucosylation se caractérise par une augmentation des structures multi-fucosylées, cela veut dire qu'au moins un résidu de fucose est localisé au niveau des antennes des glycannes. Ces résidus de fucose liés aux antennes vont participer à la formation de motifs de type Lewis. La hausse de la fucosylation peut s'expliquer de différentes façons. Cette augmentation peut être causée par une surexpression des fucosyltransférases. Cependant, les résultats que nous avons obtenus en qPCR nous montrent que les trois fucosyltransférases *FUT4*, *FUT7* et *FUT8* sont réprimées suite à l'infection mycobactérienne. *FUT8* est une α 1,6-fucosyltransférase qui lie un résidu de fucose sur le résidu de GlcNAc en position réductrice des *N*-glycannes. *FUT4* et *FUT7* sont des α 1,3-fucosyltransférases connues pour être exprimées au niveau des cellules immunitaires et notamment les macrophages (Sperandio *et al.*, 2009). Nos résultats de qPCR sur la lignée THP-1 nous indiquent que ce n'est pas une expression accrue des fucosyltransférases qui serait responsable de l'augmentation du taux de fucosylation membranaire. Par contre, il existe d'autres fucosyltransférases qui possèdent une activité α 1,3, comme la α 1,3-fucosyltransférase *FUT11*. Des études précédentes ont montré que l'expression de *FUT11* augmentait lors de la différenciation des monocytes sanguin humain en macrophages et cellules dendritiques (Trottein *et al.*, 2009). Cette fucosyltransférase est donc bien exprimée au niveau des macrophages et pourrait avoir un rôle dans la variation de la fucosylation en α 1,3.

Des études de transcriptomique ont montré que lors d'une infection par *M. tuberculosis*, l'expression des gènes des macrophages infectés est modifiée (Elass-Rochard *et al.*, 2012a; Kumar *et al.*, 2010; Silver *et al.*, 2009b). L'infection par les souches H37Rv et H27Ra de *M. tuberculosis* induit une sous-expression de la fucosidase FUCA1 (Silver *et al.*, 2009b). Cette fucosidase a la capacité de cliver les différentes liaisons osidiques liant des résidus de fucose (Cao *et al.*, 2014; DiCioccio *et al.*, 1982). Une diminution de cette activité fucosidasique est souvent associée à différentes conditions pathologiques. Plusieurs études ont montré que des cellules cancéreuses de sein ou de côlon sous-expriment la fucosidase FUCA1 (Cheng *et al.*, 2015; Otero-Estévez *et al.*, 2013). Il a été montré aussi sur des souris souffrant de polyarthrite rhumatoïde que les tissus enflammés surexpriment les α 1,3-fucosyltransférases et que cela maintient un phénotype pro-inflammatoire des macrophages. L'utilisation d'inhibiteurs de la fucosylation empêche la synthèse d'épitopes glucidiques, induit la sécrétion d'IL-10 et oriente les macrophages vers une polarisation M2 (Li *et al.*, 2014).

La fucosidase FUCA1 est une enzyme lysosomale impliquée dans la dégradation des glycoprotéines et des glycolipides. Son expression est contrôlée par le facteur de transcription p53, connu pour avoir une activité anti-tumorale en régulant la croissance et la survie des cellules cancéreuses (Ezawa *et al.*, 2016). De plus, il a été montré que ce facteur de transcription était actif sous condition inflammatoire en présence de TNF- α , qui est lui-même sécrété lors de l'infection des macrophages par *M. bovis BCG* (Holla *et al.*, 2014). Par contre, il s'agit d'une enzyme lysosomale et son expression à la membrane n'est pas connue. Il existe une seconde fucosidase, la FUCA2, qui est sécrétée à la membrane. Cette enzyme a été montrée comme impliquée dans les infections par *Helicobacter pylori*, où lors du processus infectieux, sa sécrétion est plus importante (Liu *et al.*, 2009).

L'augmentation de la fucosylation en α 1,3 au niveau de la membrane plasmique des macrophages exposés à *M. bovis BCG* corrèle avec l'augmentation de structures multi-fucosylées en spectrométrie de masse. Nous avons précédemment détaillé que les motifs Lewis X sont impliqués dans le recrutement cellulaire. Le gain de structures multi-fucosylées à la surface des cellules permet la mise en place de la réponse immunitaire et le recrutement de ces effecteurs cellulaires, notamment par interaction avec les sélectines qui reconnaissent les épitopes glucidiques de type Lewis X (Silva *et al.*, 2011).

Dans des fibroblastes de types HEK-293, il a été prouvé qu'un inhibiteur des métalloprotéinases, la protéine TIMP-1, était *N*-glycosylé. De plus, lorsque les antennes des *N*-glycannes portent des résidus de fucoses en α 1,3, cela a pour conséquence de réduire le pouvoir inhibiteur de la protéine TIMP-1. En parallèle, lors d'une infection par *M. tuberculosis*, la métalloprotéinase MMP-1 est surexprimée ce qui conduit à une augmentation de la matrice extracellulaire (Sathyamoorthy *et al.*, 2015). Ensemble, ces données nous amènent à penser que l'infection mycobactérienne conduit à une dégradation de la matrice régulée par la fucosylation de la protéine TIMP-1.

L'infection par *M. bovis BCG* peut induire l'apoptose des macrophages infectés (Riendeau and Kornfeld, 2003; Wojtas *et al.*, 2011). Or des expériences d'épigénétique ont montré que l'inhibition de la méthylation de l'ADN perturbe le métabolisme de la fucosylation en augmentant l'expression du transporteur du GDP-fucose au niveau de l'appareil de Golgi et celle de la fucosyltransférase *FUT4*. Ces phénomènes sont accompagnés d'une augmentation de l'apoptose induite par le récepteur de mort TRAIL-1 (Moriwaki *et al.*, 2010). Nous avons vu que ce récepteur est *N*-glycosylé et que la perte de la *N*-glycosylation de ce récepteur inhibait l'apoptose (Dufour *et al.*, 2017). On peut supposer qu'une infection par *M. bovis BCG* peut avoir un impact sur les flux de GDP-fucose au niveau de l'appareil de Golgi. Cela aurait pour conséquence d'augmenter la disponibilité de substrat pour les α 1,3-fucosyltransférases. Afin de suivre la dynamique de substrat au sein des macrophages lors d'une infection, il est possible d'utiliser des monosaccharides activés marqués comme le GDP-FucAz permettant ainsi d'observer par microscopie à fluorescence les flux de fucose à travers les différents compartiments cellulaires. Il a été montré précédemment que le GDP-FucAz pouvait permettre de marquer les glycannes membranaires portant du fucose (Dehnert *et al.*, 2011). L'utilisation de GDP-FucAz couplée à de la tunicamycine, un inhibiteur de la *N*-glycosylation, permettrait d'observer si les taux de fucose dans l'appareil de golgi sont plus importants après infection par *M. bovis BCG*. Cette technique de marquage, appelée click-chemistry ou chimie bio-orthogonale, a déjà fait ses preuves, notamment dans l'étude du métabolisme de l'acide sialique, mais également son recyclage (Gilormini *et al.*, 2015 ; Gilormini *et al.*, 2018).

Mais à l'heure actuelle, nous ne pouvons conclure si ces variations de glycosylation sont induites par l'agent pathogène pour favoriser l'infection ou par l'hôte pour faciliter la protection contre l'infection mycobactérienne. Afin d'étudier si la fucosylation est impliquée

dans l'apoptose induite par *M. bovis* BCG, il faudrait étudier l'apoptose des macrophages en surexprimant l'expression des fucosyltransférases. L'utilisation de fucosidase et d'inhibiteur de la fucosylation tel que le 2-fluoro-L-Fucose permettrait également de voir si la fucosylation favoriserait la réponse immunitaire ou le processus infectieux. L'emploi de cet inhibiteur a d'ores et déjà permis de mettre en évidence une perte de la prolifération et de la migration de cellules cancéreuses hépatiques (Zhou *et al.*, 2017). Récemment, il a été montré que le 6-alkinyl-fucose, un monosaccharide marqué, était également capable d'inhiber la fucosylation (Kizuka *et al.*, 2017). De plus, ce nouvel inhibiteur peut être utilisé à des concentrations élevées, puisqu'il possède une faible cytotoxicité (Kizuka *et al.*, 2016). L'utilisation de ces inhibiteurs pourra permettre la quantification des cellules apoptotiques suite à l'infection par cytométrie en flux. Puis en utilisant un marquage fluorescent spécifique des mycobactéries, il sera possible également d'observer si les variations de fucosylation peuvent impacter la phagocytose des mycobactéries par les macrophages.

Chapitre 3 : Etude des variations de glycosylation lors de l'infection des cellules dendritiques murines par *Mycobacterium bovis BCG*

I - Introduction

A l'instar des macrophages, les cellules dendritiques sont des cellules phagocytaires, présentatrices d'antigènes et des membres de l'immunité innée. Les cellules dendritiques sont classées comme des cellules présentatrices d'antigènes professionnelles, et participent au passage entre l'immunité innée et adaptative. Des différences phénotypiques et morphologiques existent entre les macrophages et les cellules dendritiques, mais la principale différence est que les cellules dendritiques vont migrer des différents tissus vers les ganglions par le système lymphatique où elles présentent les antigènes aux cellules T naïves (Randolph *et al.*, 2005; Shortman and Naik, 2007).

Les cellules dendritiques présentent au niveau de leur membrane plasmique les mêmes récepteurs que ceux retrouvés au niveau des macrophages, comme les TLRs, le MR ou le DC-SIGN (Kerrigan and Brown, 2009). De plus, comme ce sont des cellules présentatrices d'antigènes professionnelles, elles arborent de nombreuses molécules du CMH. Nous avons vu précédemment que lorsque la *N*-glycosylation des molécules du CMH ou du TCR est affectée, la présentation d'antigène est directement impactée. Il a été montré qu'une perte d'expression de la sialyltransférases ST6Gal1 au niveau des DCs conduit à une activation aberrante des lymphocytes T (Erbacher *et al.*, 2009; Hennet *et al.*, 1998; Jenner *et al.*, 2006).

Comme les macrophages, les cellules dendritiques sont en première ligne lors d'une infection bactérienne. Dans le cas de l'infection par *M. bovis BCG*, les différents récepteurs phagocytaires (DC-SIGN ; MR ; CR3) de la membrane plasmique interagissent avec les mycobactéries. Mais de ces récepteurs, le DC-SIGN peut être impliqué jusqu'à 80% des interactions avec le pathogène. Cette interaction avec le DC-SIGN se fait au niveau du

ManLAM, et plus précisément au niveau de la cape mannosylée (Maeda *et al.*, 2003). Cette activation du DC-SIGN induit la sécrétion d'IL-10 et inhibe la production d'IL-12 (Gagliardi *et al.*, 2005; Moliva *et al.*, 2017)

Les DCs immatures humaines peuvent également être activées au niveau des TLRs (TLR2 ; TLR4) par *M. bovis BCG*, ce qui conduit à la production de cytokines inflammatoires (TNF α , IL-1 β , IL-12). Dans des macrophages de souris déficientes en TLR2 et TLR4, cette production de cytokines pro-inflammatoires est fortement réduite (Oswald *et al.*, 1997; Tsuji *et al.*, 2000). Chez les DCs de souris, l'infection par *M. bovis BCG* induit une importante réponse inflammatoire. La première réaction est une synthèse importante de cytokines pro-inflammatoires (TNF α ; IL-12 ; IL-6), puis à partir de 24h d'infection, la production de cytokines anti-inflammatoires de type IL-10 et IL-4 apparaît plus importante (Zhang *et al.*, 2013). En vue du contexte inflammatoire, il serait donc plausible que les cellules dendritiques adoptent également un remodelage de leur glycosylation dans le cadre d'une infection mycobactérienne.

Afin d'étudier la glycosylation des cellules dendritiques, nous avons entamé une collaboration avec le Dr. François Trottein, de l'institut Pasteur de Lille. Les cellules dendritiques ont été isolées de moelle osseuse de souris, à partir de laquelle des cellules progénitrices sont récoltées. L'étape de différenciation s'effectue en deux semaines, dans un milieu complétement en GM-CSF. L'isolement, la différenciation et l'infection des cellules dendritiques ont été effectués à l'institut Pasteur, tandis que les étapes d'extraction et d'analyse des différents glycoconjugués ont été réalisées dans notre laboratoire.

L'activation des cellules dendritiques a également été effectuée à l'institut Pasteur de Lille. L'infection par *M. bovis BCG* induit la sécrétion d'IL-6 et d'IL-12, comme cela a été précisé ci-dessus. L'analyse de l'expression de marqueurs de surface par FACS a été effectuée. Comme décrit dans la littérature, les marqueurs de type CD40, CD86 et le CMH II sont surexprimés après infection des DCs (Banchereau and Steinman, 1998).

II – Résultats Préliminaires

A – Analyses des profils de glycosphingolipides après infection des cellules dendritiques par *M. bovis BCG*

Les deux chapitres précédents ont montré l'efficacité de notre méthode d'analyse des glycosphingolipides, et sa capacité à mettre en avant des variations structurales. Nous avons suivi le même protocole pour déterminer la composition en GSLs des cellules dendritiques (Figure 72 ; Tableau 9).

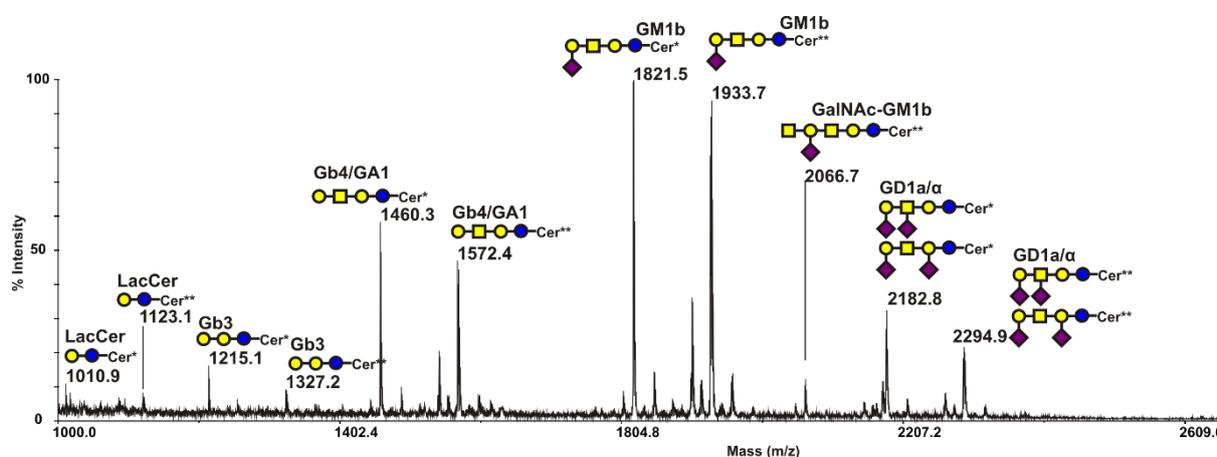


Figure 72 - Spectre de masse MALDI-TOF représentatif des GSLs perméthylés des cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse de souris

Les cellules dendritiques issues de la moelle osseuse de souris présentent un profil de GSLs riche en gangliosides et sont principalement composées des céramides de type [d18:1 - C16:0 (Cer*)] et [d18:1 - C24:0 (Cer**)]. Les structures de plus bas poids moléculaire représentent des glycolipides neutres comme le LacCer, Gb3 et un mélange de Gb4/GA1. Contrairement aux macrophages où le GM3 est le GSL majoritaire, les cellules n'en présentent pas ou seulement des traces. Le GM1 est la structure prédominante et les expériences de fragmentation nous indiquent qu'il s'agit plus précisément de GM1b (Figure 73). La présence du couple d'ions fils m/z 1109/847 et l'absence de l'ion fils m/z 486 confirment qu'il ne s'agit pas d'un mélange de GM1a et de GM1b, mais uniquement du GM1b.

Acides Gras	GSLs	Masse moléculaire mono-isotopique			Composition
		Théorique	Témoins	+ <i>M. bovis</i> BCG	
C16:0	LacCer	1010.8	✓	✓	Hex ₂ -Cer ⁵⁴⁸
C24:0	LacCer	1122.9	✓	✓	Hex ₂ -Cer ⁶⁶⁰
C16:0	G _{b3}	1214.9	✓	✓	Hex ₃ -Cer ⁵⁴⁸
C24:0	G _{b3}	1326.9	✓	✓	Hex ₃ -Cer ⁶⁶⁰
C16:0	G _{b4} /G _{A1}	1460.0	✓	✓	Hex ₃ HexNAC ₁ -Cer ⁵⁴⁸
C24:0	G _{b4} /G _{A1}	1572.1	✓	✓	Hex ₃ HexNAC ₁ -Cer ⁶⁶⁰
C16:0	G _{M1a/b}	1821.2	✓	✓	NeuAc ₁ Hex ₃ HexNAC ₁ -Cer ⁵⁴⁸
C24:0	G _{M1a/b}	1933.3	✓	✓	NeuAc ₁ Hex ₃ HexNAC ₁ -Cer ⁶⁶⁰
C24:0	GalNAC-G _{M1b}	2066.2	✓	✓	NeuAc ₁ Hex ₃ HexNAC ₂ -Cer ⁶⁶⁰
C16:0	G _{D1a}	2182.3	✓	✓	NeuAc ₂ Hex ₃ HexNAC ₁ -Cer ⁵⁴⁸
C24:0	G _{D1a}	2294.4	✓	✓	NeuAc ₂ Hex ₃ HexNAC ₁ -Cer ⁶⁶⁰

Tableau 9 - Affectation des ions moléculaires ([M + Na] +) observés dans les spectres MALDI-TOF de glycosphingolipides perméthylés des cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse de souris témoins et infectées par *M. bovis* BCG

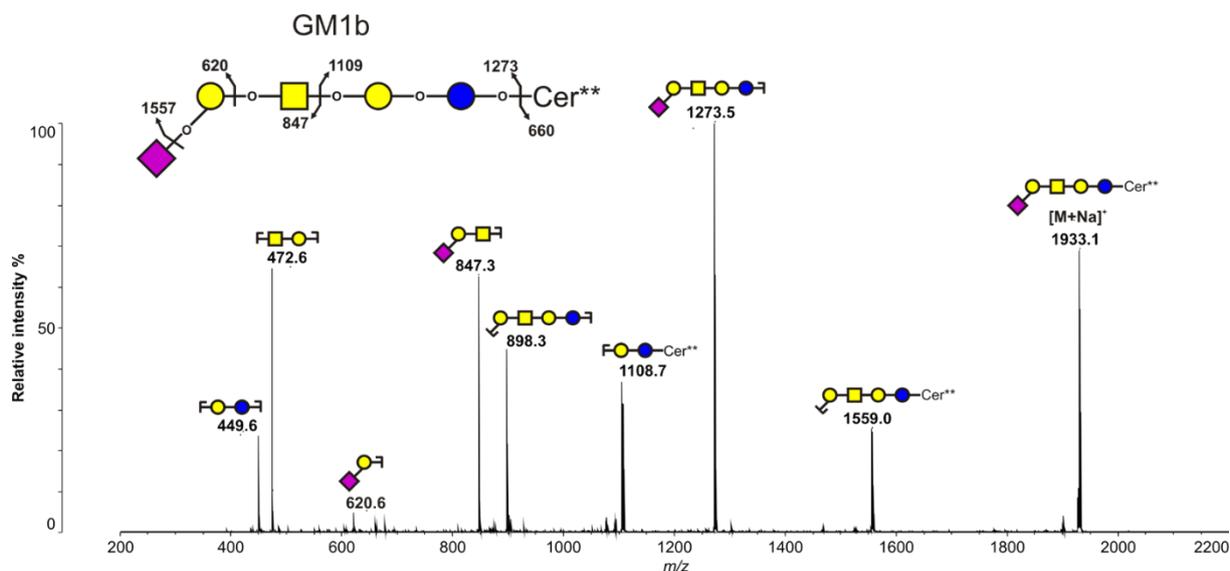


Figure 73 - Analyse MS/MS de l'ion m/z 1933 du GSL perméthylé GM1b des cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse de souris

Des structures di-sialylées de type GD1 sont également détectées. Dans la première partie de nos travaux, nous avons évoqué qu'il pouvait y avoir quatre isomères différents formant du GD1 : le GD1a, le GD1b, le GD1c et le GD1α. L'analyse MS/MS effectuée sur l'ion parent m/z 2182.8 met en évidence la présence d'un mélange de deux isomères du GD1 : Le GD1a et le

GD1 α (Figure 74). Le couple d'ions fils m/z 847/1358 confirme la présence de l'isomère GD1a. Le couple d'ion fils m/z 1208/997 confirme quant à lui la présence de l'isomère de la série α . Aucun ion fils m/z 759 n'est détecté, ce qui exclut les isomères GD1b et GD1c. L'ion fils m/z 759 est caractéristique d'un fragment poly-sialylé (Neu5Ac α 2,8Neu5Ac).

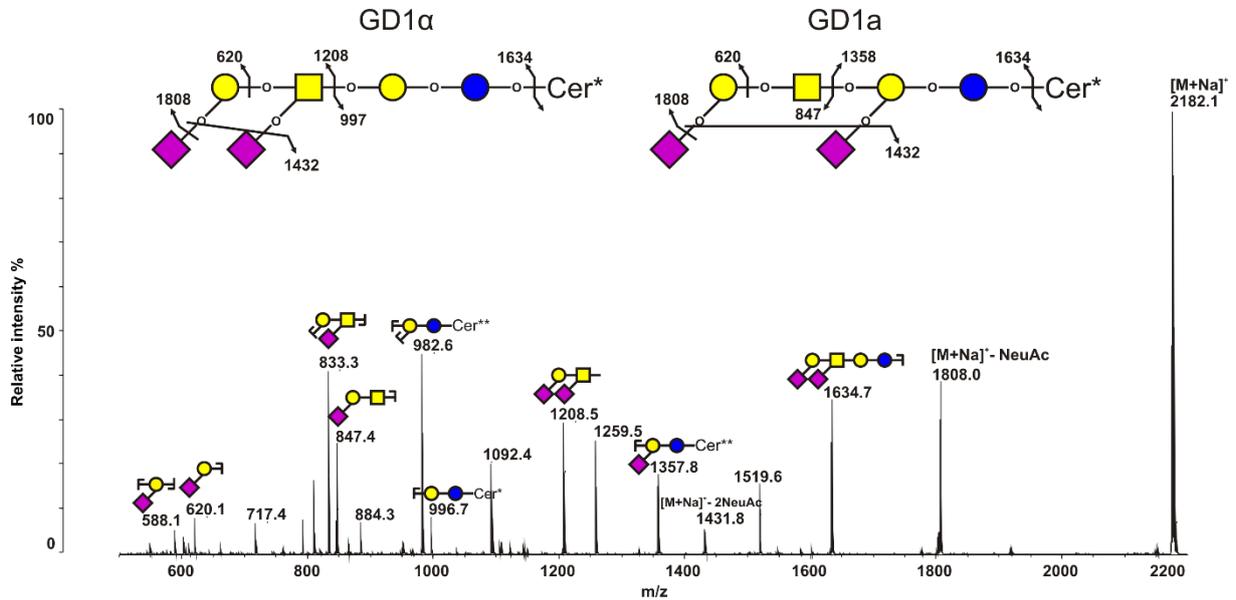


Figure 74 - Analyse MS/MS de l'ion m/z 2182 des GSLs perméthylés GD1a/GD1 α des cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse de souris.

Les cellules dendritiques ont suivi le même protocole d'infection par *M. bovis* BCG que les macrophages. Après infection, les cellules présentent le même profil de GSLs que les cellules témoins.

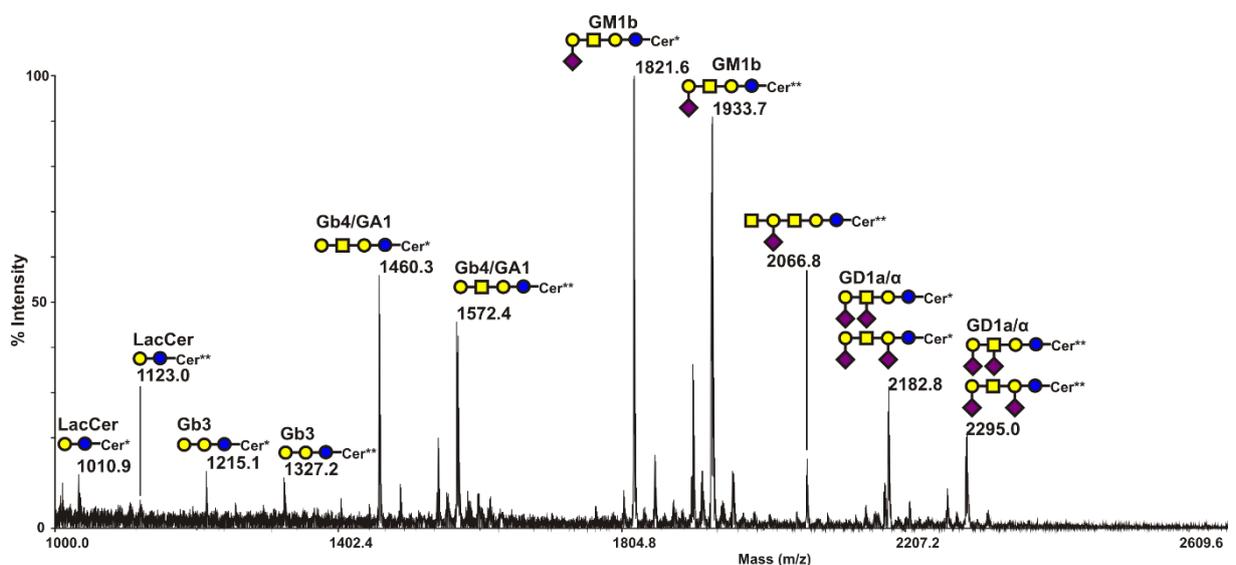


Figure 75 - Spectre de masse MALDI-TOF représentatif des GSLs perméthylés des cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse de souris infectées par *M. bovis* BCG

L'expérience n'a été réalisée qu'une seule fois, mais ces résultats préliminaires nous indiquent que l'infection par *M. bovis BCG* ne modifierait pas non plus la composition globale en GSLs des cellules dendritiques (Figure 75).

B – Analyses des profils de *N*-glycosylation après infection des cellules dendritiques par *M. bovis BCG*.

Comme pour l'étude de la *N*-glycosylation chez les macrophages primaires, nous avons utilisé l'extraction au Triton X-100 des glycoprotéines pour notre analyse. Les glycanes libérés des cellules dendritiques contrôles et infectées sont purifiés sur cartouche de C18 et perméthylés avant analyse MALDI-TOF.

Les cellules dendritiques présentent, comme les macrophages, un fort taux de *N*-glycanes de type oligomannosidique composés de cinq à neuf résidus de mannose (m/z 1579.7, 1783.8, 1987.9, 2192.0 et 2391). Les autres glycanes détectés sont des glycanes de type complexe bi- et tri-antennés. Tous les *N*-glycanes complexes détectés sont mono-fucosylés avec au moins un résidu d'acide sialique. Par contre, on remarque sur certaines structures, la présence de motifs Gal-Gal comme sur le NeuAc₁Fuc₁Hex₆HexNAc₄ à m/z 2809.2 (Figure 76A).

Après infection par *M. bovis BCG*, les cellules dendritiques présentent un profil similaire à celui des cellules témoins. Les structures les plus abondantes sont toujours les glycanes de type oligomannosidique, et peu de structures complexes sont détectées (Figure 76B). Les quelques glycanes détectés sont, comme pour le témoin, des structures bi- et tri-antennées mono-fucosylées. Deux nouvelles structures tri-antennées sont détectées mais en très faible quantité. Ces deux structures présentent des résidus de galactose supplémentaires, ce qui indiquerait une augmentation du motif Gal-Gal. Mais les très faibles signaux de ces structures ne semblent pas significatifs. Pour confirmer ce résultat, l'expérience devra être répétée.

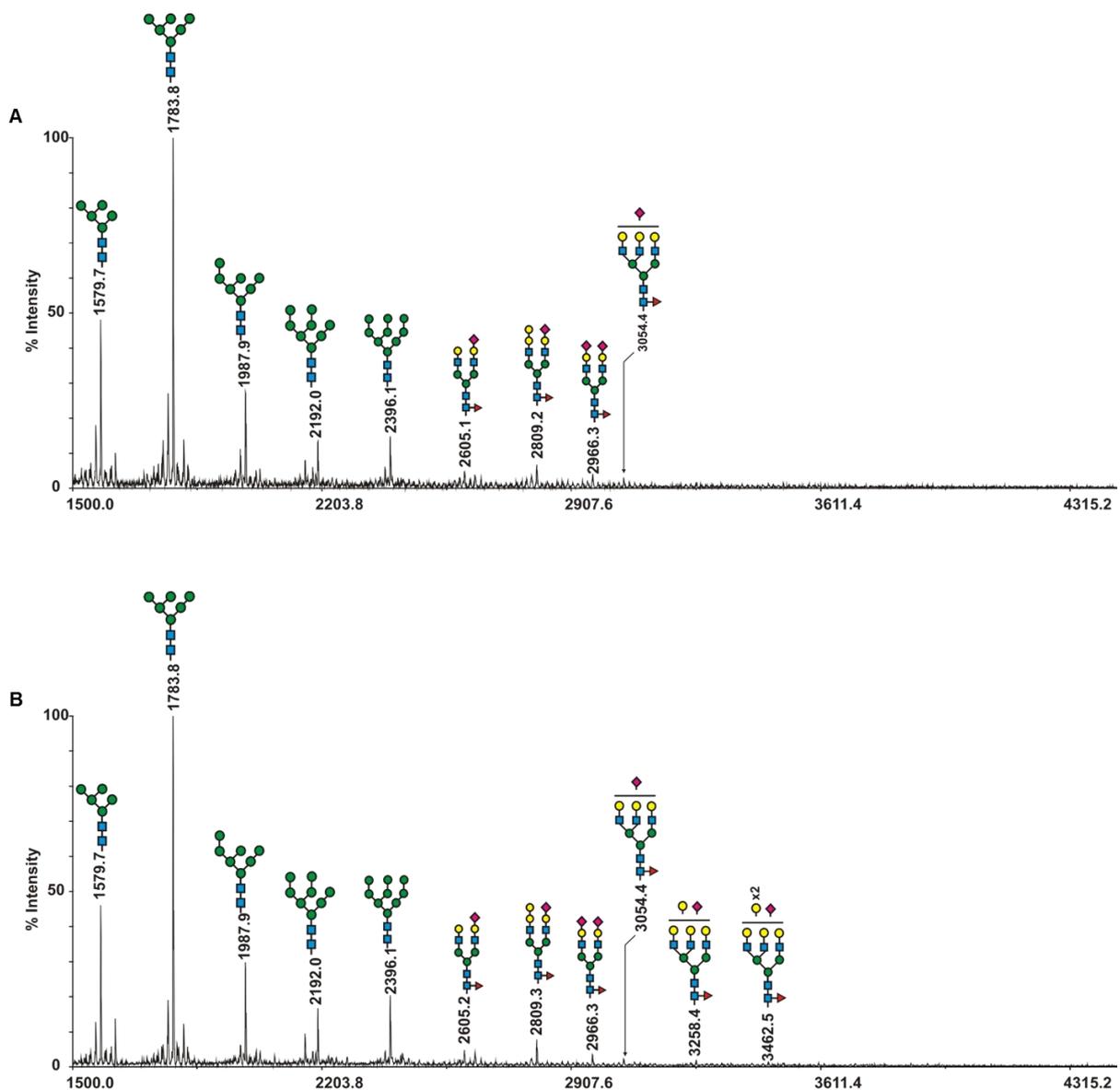


Figure 76 - Spectre de masse MALDI-TOF représentatif des *N*-glycannes perméthylés des cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse de souris témoins (A) et infectées par *M. bovis BCG* (B)

C – Analyses des profils de *O*-glycosylation après infection des cellules dendritiques par *M. bovis BCG*.

Les peptides *N*-déglycosylés sont récoltés lors de la purification sur cartouche de C18, lyophilisés, et beta-éliminés. Après libération des *O*-glycannes, ces derniers sont purifiés sur une colonne de Dowex 50x2 et perméthylés.

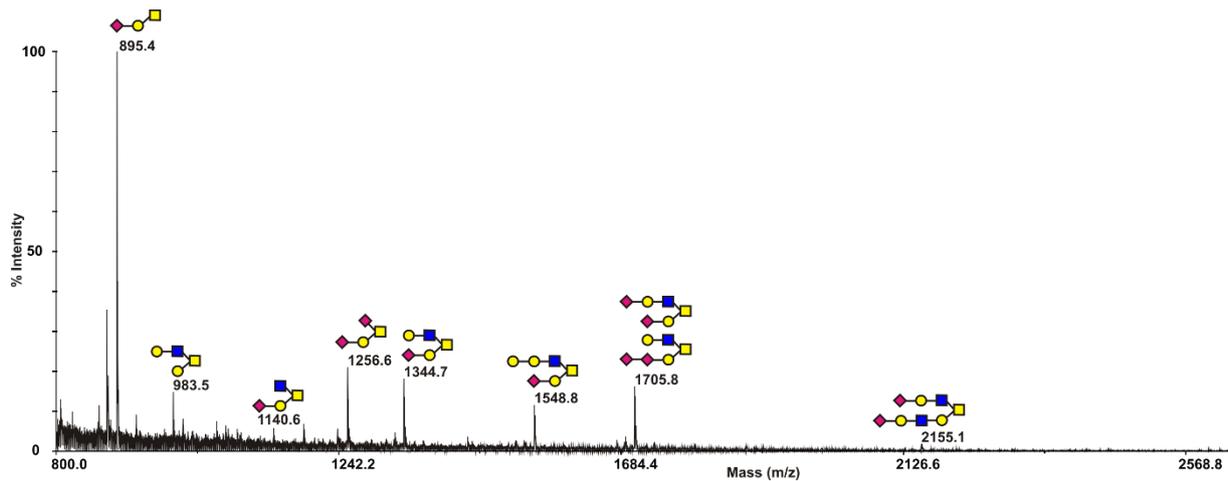


Figure 77 - Spectre de masse MALDI-TOF représentatif des *O*-glycannes perméthylés des cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse de souris

Les cellules dendritiques de souris présentent des *O*-glycannes de noyau de type 1 (Gal β 1,3GalNAc) et de type 2 (Gal β 1-3[GlcNAc β 1-6]GalNAc). Excepté l'ion m/z 983.5, tous les *O*-glycannes détectés en spectrométrie de masse sont sialylés avec au minimum un résidu d'acide sialique. Par contre, aucune de ces structures ne possède de résidu de fucose. La fragmentation de l'ion m/z 1548.8 confirme la présence d'un motif Gal-Gal, comme au niveau des *N*-glycannes (Figure 78). La fragmentation de l'ion parent m/z 1548 donne le couple d'ion m/z 690/881, qui indique la présence de ce motif.

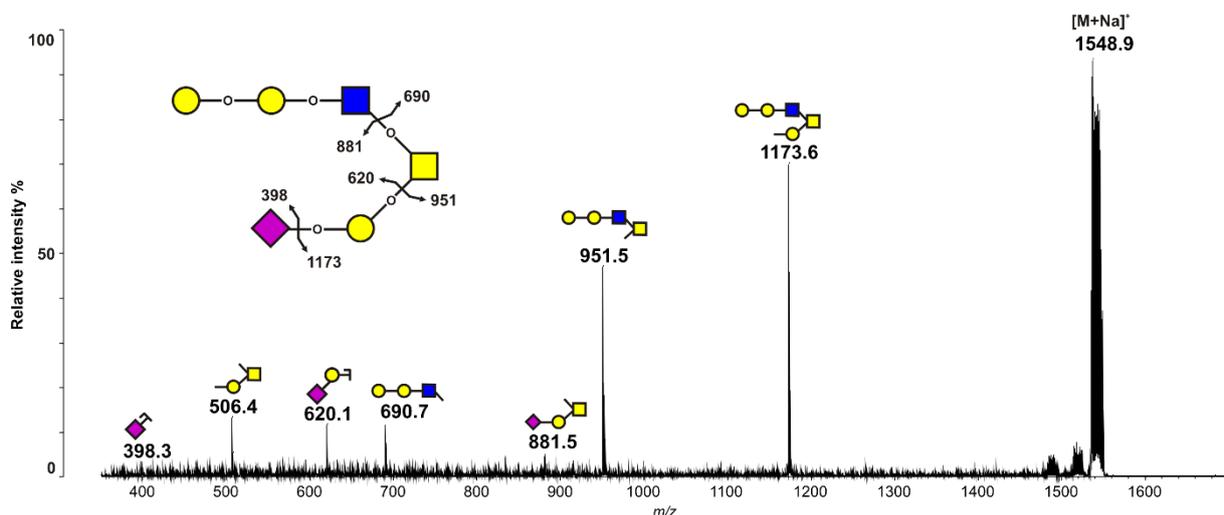


Figure 78 - Analyse MS/MS de l'ion m/z 1548 des *O*-glycannes des cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse de souris

Nous avons ensuite comparé les profils de *O*-glycannes des cellules dendritiques infectées par *M. bovis* BCG, et comme pour les GSLs et les *N*-glycannes, nous n'avons pas observé de

variation entre les cellules contrôles et les cellules infectées (Figure 79). Cependant, l'expérience ayant été réalisée une seule fois, ces résultats sont à confirmer.

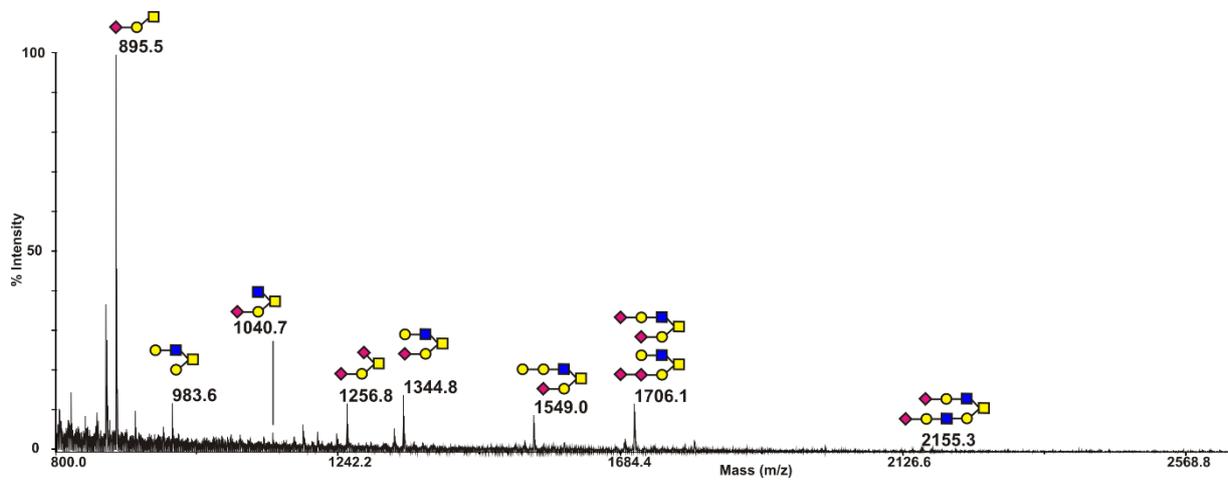


Figure 79 - Spectre de masse MALDI-TOF représentatif des O-glycannes perméthylés des cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse de souris infectées par *M. bovis BCG*.

III - Discussion

Dans cette dernière partie, nous avons mis en lumière le glycome complet des cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse de souris. Les profils de GSLs montrent une riche teneur en gangliosides, en particulier du GM1, mais également du GalNAc-GM1. De plus, les analyses MS/MS ont révélé que ces cellules présentaient un isomère rare du GD1, le GD1 α . La présence de gangliosides de la série alpha a déjà été mise en évidence au niveau des macrophages, de lymphocytes T et B de souris mais pas au niveau des cellules dendritiques (Yohe *et al.*, 1997). Par la suite, le GD1 α a été montré comme étant impliqué dans l'adhésion des cellules métastatiques de lymphome aux cellules épithéliales (Taki *et al.*, 1997). Plus récemment, il a été montré sur des lignées cancéreuses de cancer du sein que les gangliosides de type GD1 α diminuaient l'interaction des cellules métastatiques avec l'endothélium de la barrière hémato-encéphalique (Drolez *et al.*, 2016; Vandermeersch *et al.*, 2015 ; Annexe 1 et 2). Concernant le GalNAc-GM1b, il a déjà été identifié dans des tissus lymphoïdes murins mais son rôle n'a pas été identifié (Kovacic *et al.*, 2000).

L'analyse des *N*-glycannes nous révèle une nouvelle fois que les cellules immunitaires présentent un fort taux de glycannes de type oligomannosidique. Les glycannes de type complexe observés sont tous fucosylés et sialylés, mais ils présentent également des motifs Gal-Gal. Ce motif Gal-Gal est également retrouvé sur des structures de *O*-glycannes. Les *O*-glycannes détectés présentent un fort taux de sialylation, mais aucun résidu de fucose n'est présent sur les différentes structures observées. Cette perte de fucosylation peut être associée à la différenciation des cellules progénitrices en cellules dendritiques. Julien *et al.* ont montré que lors de la différenciation des monocytes sanguins humains en cellules dendritiques, il y avait une nette diminution de la fucosylation des *O*-glycannes. Bax *et al.* ont décrit les profils de *N*- et *O*-glycosylation des cellules dendritiques humaines lors de leur maturation par le LPS. Ils présentent un nombre important de structures de *N*-glycannes avec des structures multi-fucosylées plus importantes lors de la maturation. Nos résultats ne montrent pas de nouvelles structures après infection, mais les signaux des structures oligomannosidiques sont si intenses qu'ils peuvent masquer ceux des différentes structures complexes. Les structures de *O*-glycannes ne présentent pas de résidu de fucose, comme nous le retrouvons sur les souris. Par contre, les différents glycannes (*N*- et *O*-) ne présentent pas de motifs Gal-Gal (Bax *et al.*, 2007).

Au niveau des cellules murines, il est également connu que les glycanes qu'elles arborent peuvent être porteurs d'un autre type d'acide sialique que le Neu5Ac, le Neu5Gc (acide *N*-glycolylneuraminique). Cet acide sialique particulier a d'abord été retrouvé au niveau des gangliosides murins (Müthing *et al.*, 1994), mais on retrouve du Neu5Gc chez les autres mammifères à l'exception de l'homme. Cependant, aucune trace de Neu5Gc n'a été relevée sur les analyses des différents glycoconjugués des cellules dendritiques murines. Bax *et al.* ont également effectué des analyses sur ces mêmes cellules, et ils n'ont également pas détecté de Neu5Gc. En 2011, des travaux ont montré que l'activation des lymphocytes T murins conduit à une diminution du taux de Neu5Gc, balancée par une augmentation du taux de Neu5Ac (Redelinghuys *et al.*, 2011). On peut émettre l'hypothèse que la maturation des cellules dendritiques conduit à une perte de la production de Neu5GC. Pour répondre à cette question, il faudrait étudier le glycome lors des différentes étapes de différenciation des cellules dendritiques à partir du précurseur myéloïde.

Cependant, pour l'ensemble des glycoconjugués, l'infection par *M. bovis BCG* des cellules dendritiques ne conduit pas aux mêmes résultats que ceux observés sur les macrophages. A l'heure actuelle, il ne s'agit que de résultats préliminaires et les expériences ont besoin d'être répétées. Mais dans tous les cas, nous avons mis en évidence l'ensemble du glycome des cellules dendritiques murines, expérience qui n'a pas été réalisée jusqu'à maintenant.

Conclusion générale

Au cours de ma thèse, nous avons dans un premier temps voulu mettre au point une méthodologie pour l'analyse de la glycosylation des cellules immunitaires. Cette étape technique mais indispensable nous a permis d'élaborer une stratégie basée en grande partie sur la spectrométrie de masse, la cytométrie en flux et l'analyse qPCR. Dans le cadre de la glycosylation lors de l'infection mycobactérienne, il nous a fallu choisir un modèle d'étude. La lignée leucémique monocyttaire THP-1 a permis d'appliquer la stratégie développée, et de mettre en évidence les variations du glycome lors de la différenciation des monocytes THP-1 en macrophages, mais également de mettre en lumière la glycosylation totale de ce modèle cellulaire. En combinant différentes approches analytiques telles que l'analyse structurale des glycanes par spectrométrie de masse, la détection d'épitopes glucidiques et la quantification de l'expression de gènes codant des glycosyltransférases, nous avons démontré que la différenciation des cellules THP-1 monocytaires en macrophages conduit tout d'abord à un remodelage des profils de glycosphingolipides, et plus particulièrement à une production beaucoup plus importante de gangliosides. Cette augmentation de structures sialylées est en grande partie la conséquence d'une surexpression de la ST3GAL5 ou GM3 synthase, la première enzyme spécifique à la voie de biosynthèse des gangliosides. Son action permet la synthèse de GM3 qui va servir de substrat pour la synthèse des autres structures de type GM1, GM2, GD3 et GD1. Cette différenciation induit également des variations des profils de *N*-glycosylation des cellules THP-1, dont principalement une hausse du taux de *N*-glycanes de type complexe. Cette augmentation de *N*-glycanes de type complexe s'accompagne d'une hausse de l'antennarisation de ces glycanes, corrélée à une augmentation de l'expression des enzymes impliquées dans l'antennarisation telles que la MGAT1, MGAT5 et B4GALT1. Nous avons détecté des *N*-glycanes de type complexe principalement mono-fucosylés et une diminution des structures multi-fucosylées après traitement par le PMA. Ce résultat est conforté par l'augmentation du taux d'ARNm codant *FUT8* et la diminution du niveau d'ARNm de *FUT4*. Enfin, cette différenciation induit une perte d'expression de Sialyl Lewis X à la membrane des macrophages, en accord avec une surexpression de la sialidase NEU1, connue pour être surexprimée lors de la différenciation macrophagique.

Après avoir décrypté le glycome de la lignée THP-1, nous avons voulu l'étudier lors de l'infection par *M. bovis BCG*. En plus du modèle THP-1, nous avons étendu notre étude à un second modèle, les macrophages dérivés de monocytes de sang humain. Lors de cette

infection mycobactérienne, nous avons prouvé que la *N*-glycosylation est modifiée, et que les taux de fucosylation des glycanes augmentaient. De plus, l'utilisation de lectines végétales fluorescentes démontre que cette augmentation de fucosylation est spécifique de la fucosylation en α 1,3. Cependant, l'étude des différentes α 1,3-fucosyltransférases exprimées au niveau des cellules immunitaires semble indiquer que cette augmentation ne serait pas dépendante de leur expression génique.

Enfin, nous avons commencé une étude sur la glycosylation des cellules dendritiques de souris infectées par *M. bovis BCG*. Ces résultats préliminaires ne nous indiquent pour l'heure aucun changement de glycosylation suite à l'infection par les mycobactéries. Cependant, cela a permis de mettre en lumière l'ensemble du glycome des cellules dendritiques murines. Même si l'infection mycobactérienne n'induit pas de changements structuraux de la glycosylation, ces données pourront servir à une meilleure compréhension du rôle de la glycosylation dans certains phénomènes immunitaires impliquant les cellules dendritiques.

Matériels et méthodes

I – Cultures cellulaires et Mycobactériennes

A - Culture cellulaire de lignée THP-1

Les cellules issues de la lignée cellulaire monocyttaire humaine THP-1 (ECACC n°88081201) sont ensemencées à une densité de 3×10^5 cellules par ml dans du milieu RPMI-1640 supplémenté de 10% de SVF (sérum de veau fœtal) décomplémenté, 2 mM de L-glutamine, 20 μ M de β -mercaptoethanol et maintenues dans une atmosphère humide avec 5% de CO₂ à 37°C. La différenciation des THP-1 en macrophages est réalisée par resuspension des cellules THP-1 à 4.5×10^5 cellules par mL dans du milieu de culture supplémenté de 20 nM de phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) pendant 72h. Le traitement par le PMA induit l'adhésion des macrophages THP-1 au plastique contrairement aux cellules monocytaires non différenciées qui restent en suspension. La viabilité cellulaire est évaluée grâce à l'exclusion hors des cellules du colorant bleu-trypan ou grâce à la cytométrie en flux (FACSCalibur flow cytometer) en utilisant l'iodure de propidium.

B – Purification des monocytes issus de sang humain et différenciation en macrophages primaires (MDMs)

Les échantillons de sang humain provenant de donneurs sains sont collectés au centre de transfusion sanguin local (Etablissement Français du Sang, Lille). Les PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells) sont isolées par une centrifugation sur gradient de Ficoll (Lymphoprep, AbCys). Les monocytes sont purifiés à partir des PBMC grâce à des billes magnétiques couplées au CD14, selon les instructions du fabricant (Miltenyi Biotec). La préparation des monocytes est à un degré de pureté de plus de 95% comme vérifié par cytométrie en flux. Les MDMs sont obtenus en incubant les monocytes fraîchement isolés (10^6 cellules/ml) dans du milieu RPMI 1640 complet supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal (SVF) et de 10 ng/ml de GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor) pendant 6 jours comme précédemment décrit dans la littérature (Ohradanova-Repic *et al.*, 2016). Du milieu frais contenant du GM-CSF est ajouté après 2 et 4 jours.

C – Culture des mycobactéries de la souche *Mycobacterium bovis BCG*

La souche *Mycobacterium bovis BCG* est obtenue de l'Institut Pasteur (Lille, France). Les mycobactéries sont cultivées dans du milieu Sauton en agitation à 37°C. Le milieu Sauton est préparé comme décrit par Larsen *et al* (Larsen *et al.*, 2007). Une coloration de type Ziel-Neelsen a permis la détection des bacilles acido-alcool-résistants.

D - Infection ou activation des macrophages

Six jours après la différenciation des monocytes en M₀, les macrophages adhérents sont infectés avec *Mycobacterium bovis BCG* à un MOI 5 :1 dans du milieu complet sans antibiotiques et maintenus dans une atmosphère humide avec 5% de CO₂ à 37°C pendant 48 h. L'activation des macrophages avec 0.5 µg/ml de lipopeptide mycobactérien Lp19 est réalisée dans les mêmes conditions. Le lipopeptide synthétique mycobactérien mimétique de la lipoprotéine 19-kDa de *M. tuberculosis* (Pam₃CYS-SSNKSTTGSGETTTA appelé PAM₃LP₁₉) est produit par GmbH EMC microcollection (Allemagne).

II – Purifications et analyses des glycoconjugués

A - Extraction et purification des glycolipides

Les cellules THP-1 et les MDMs sont détachées des flasques T175 avec la solution de dissociation cellulaire non enzymatique et lavées trois fois au PBS. Les cellules (2x10⁷) sont lyophilisées et les glycolipides sont extraits trois fois avec un mélange CHCl₃/CH₃OH (2:1, v/v) et une fois avec du CHCl₃/CH₃OH (1:2, v/v) en utilisant des centrifugations intermédiaires à 2500 g pendant 20 min. Ces fractions organiques sont rassemblées, séchées sous flux d'azote et saponifiées en condition douce avec une solution de NaOH 0.1M dans du CHCl₃/CH₃OH (1:1, v/v) pendant 2 h à 37°C. Après évaporation, les glycolipides sont repris dans un mélange CH₃OH/0.1% TFA (1:1, v/v) et finalement purifiés sur colonne C18 (Waters, Milford, MA, USA) équilibrée dans le même solvant. Après lavage avec un mélange de CH₃OH/0.1% TFA (1:1, v/v), les GSLs sont élués par un mélange CH₃OH, CHCl₃/CH₃OH (1:1, v/v) et CHCl₃/CH₃OH (2:1, v/v). Les fractions éluées sont séchées sous azote avant les futures analyses structurales.

B – Libération séquentielle et purification des *N*- et *O*-glycannes

Les cellules sont resuspendues dans 6 M de chlorure de guanidium et 5 mM EDTA dans 0.1 M de Tris/HCl, pH 8.4 et agitées pendant 4 h à 4°C. Ensuite, le dithiothréitol est ajouté à une concentration finale de 20 mM et incubé pendant 5 h à 37°C, suivi par l'addition de 50 mM d'iodoacétamide toute la nuit dans le noir à température ambiante. Les glycoprotéines réduites et alkylées sont dialysées contre l'eau à 4°C pendant 72 h et lyophilisées. Les échantillons sont incubés avec de la trypsine TPCK (Sigma-Aldrich) à un ratio 20 :1 (w/w) dans 50 mM de NH₄HCO₃, pH 8.5, pendant 24 h à 37°C. La digestion est arrêtée par l'incubation à 100°C pendant 5 min, suivie par une chromatographie sur colonne C₁₈ Sep-Pak (Waters Corp., Guyancourt, France). La colonne C₁₈ Sep-Pak est équilibrée dans 5% d'acide acétique et lavée dans le même solvant. Les échantillons sont chargés sur la colonne et les peptides fixés sont élués avec 20%, 40% et 60% (v/v) de propanol dans 5% d'acide acétique, poolés et lyophilisés. Les *N*-Glycannes sont relargués par une digestion grâce à 10 U de *N*-glycosidase F (Roche) dans 50 mM de tampon NH₄HCO₃ pH 8.4 sur la nuit à 37°C. Les *N*-glycannes et les *O*-glycopeptides sont séparés sur une colonne C₁₈ Sep-Pak puis soumis au même protocole que décrit précédemment.

Les fractions propanoliques contenant les *O*-glycopeptides sont poolées puis congelées. Pour libérer les *O*-glycannes, les peptides sont soumis à une β -élimination réductive dans 1 M de NaBH₄ et 0.1 M NaOH à 37°C pendant 72 h. La réaction est arrêtée par l'addition d'une résine échangeuse de cations Dowex 50x8 jusqu'à ce que le pH 6.5 soit atteint. Après évaporation, l'acide borique est co-distillé en présence de méthanol. Le matériel total est ensuite soumis à une chromatographie échangeuse de cations sur une colonne Dowex 50x2 pour éliminer les peptides résiduels.

C - Libération des *N*-glycannes sur membrane de PVDF

Les cellules dénaturées (dans 5.8 M de GuHCl et 5 mM de DTT) sont platées et incubées pendant 30 min à 60°C sur une plaque 96 puits HTS préconditionnée avec une membrane hydrophobe Immobilon-P PVDF. La plaque est mélangée pendant 5 min puis centrifugée 1 min à 500 g. Les puits sont lavés 2 fois avec 200 μ l d'eau mQ, centrifugés puis lavés une fois avec

200 µl de 100 mM de NaHCO₃ (1 min, 500 g). Les *N*-glycannes sont relargués grâce à une incubation sur la nuit à 37°C avec 1 mU de PNGase F (Roche) dans 50 µl de 100 mM de NaHCO₃. Les glycannes sont récupérés dans les puits par centrifugation à 1000 g pendant 2 min. Les *N*-glycannes sont éthyl-esterifiés comme décrit par (Reiding *et al.*, 2014), en ajoutant 0.25 M de HOBt et 0.25 M d'EDC dans l'éthanol et en incubant 1 h à 37°C. Pour finir, l'ACN est ajouté et les échantillons sont placés à -20°C pendant 30 min. Les échantillons sont purifiés par coton HILIC SPE, et élués avec de l'eau et directement déposés sur plaque MALDI TOF

D – Relargage et purification des *N*-glycannes après extraction au Triton X-100

Les cellules sont resuspendues dans un tampon d'extraction Triton X-100 (1% de Triton X-100 dans du PBS). Pour lyser les cellules, la suspension est placée au bain à ultrasons pendant 30 min. Les débris et la fraction insoluble sont retrouvés dans le culot par centrifugation à 13 000 rpm pendant 10 min à 4°C et le supernageant est gardé. 1/10 de volume de 0.1 M de DTT est ajouté à une concentration finale de 10 mM et incubé à 37°C pendant 1 h, puis 1/10 de volume de 0.5 M d'iodoacétamide est ajouté pendant 1 h à l'obscurité à 37°C. Les glycoprotéines réduites et alkylées sont précipités par 1/9 de volume d'acide trichloroacétique à une concentration finale de 10% à -20°C pendant 30 min. Le culot est précipité par centrifugation à 13 000 rpm pendant 10 min à 4°C puis le surnageant est éliminé.

Le culot est remis en suspension, lavé par 1 ml d'acétone froid et centrifugé à 13 000 rpm pendant 10 min à 4°C. Ces étapes sont répétées trois fois. Les échantillons sont incubés avec de la trypsine (Sigma-Aldrich) dans 50 mM de NH₄HCO₃, pH 8.4 sur la nuit à 37°C. La réaction est arrêtée en étant portée à ébullition à 100°C pendant 5 min. Les *N*-glycannes sont relargués grâce à une digestion par la *N*-glycosidase F (BioLabs) réalisée à 37°C pendant 1 jour et les *N*-glycannes et *O*-glycopeptides sont séparés par chromatographie sur colonne C₁₈ Sep-Pak. Cette colonne est équilibrée au préalable dans 5% d'acide acétique et lavée dans le même solvant. Les échantillons sont chargés sur la colonne et les *N*-glycannes relargués sont élués avec 5% d'acide acétique et les peptides fixés avec 20%, 40% et 60% (v/v) de propanol dans 5% d'acide acétique, poolés et lyophilisés.

E – Analyse des glycannes par spectrométrie de masse

Les glycannes et les glycolipides sont perméthylés selon la méthode de Ciucanu and Kerek (Ciucanu and Kerek, 1984) avant l'analyse par spectrométrie de masse. Brièvement, les échantillons sont repris par un mélange DMSO/NaOH/ICH₃ puis incubés 2 h au bain à ultrasons. La réaction est arrêtée par l'ajout d'eau et les composés perméthylés sont extraits par le CHCl₃ et lavés 7 fois avec de l'eau.

Les glycannes éthyl-esterifiés et perméthylés sont solubilisés dans le CHCl₃ ou l'eau, mélangés à une matrice d'acide 2,5-dihydrobenzoïque (10 mg/mg dissout dans un mélange CHCl₃/CH₃OH (1:1, v/v)) puis déposés sur une plaque MALDI. Les analyses sont réalisées sur un spectromètre de masse MALDI-TOF Voyager Elite DE-STR (Perspective Biosystems, Framingham, MA, USA) ou par spectromètre 4800 MALDI-TOF/TOF (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA). Les spectromètres opèrent en mode réflectron positif avec une tension d'accélération de 20 kV et un délai d'extraction de 200 ns. Pour chaque spectre, 5000 impacts laser sont réalisés et accumulés.

III – Quantification de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires après infection

Après 8 h ou 24 h d'activation, le surnageant cellulaire est récupéré et analysé afin de détecter la quantité de TNF- α et d'IL-1 β par sandwich ELISA selon les instructions du fabricant (Ozyme S.A.). Les concentrations en cytokines sont déterminées en utilisant des droites standards obtenues grâce au TNF- α et à l'IL-1 β recombinantes humaines. Les significativités statistiques sont déterminées grâce au test t-Student (seules les valeurs de $p < 0.05$ sont considérées comme étant significatives).

IV – Expression des marqueurs de surfaces et des épitopes glucidiques.

A – Analyse des marqueurs de surface par cytométrie en flux

1 - Lors de la différenciation des cellules THP-1 par le PMA

La différenciation phénotypique des cellules THP-1 en macrophages est contrôlée par l'analyse en cytométrie en flux des niveaux d'expression d'une molécule d'adhésion présente à la surface cellulaire, le CD11c, dans les cellules non traitées et dans les cellules traitées au PMA. Les cellules adhérentes traitées au PMA sont détachées grâce à une solution de dissociation cellulaire non enzymatique (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) puis lavées trois fois au PBS. La détection du marqueur à la surface cellulaire est réalisée par fixation d'un anticorps anti-CD11c de souris couplé à la FITC (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France).

2 - Lors de l'activation des macrophages par M. bovis BCG

L'activation des cellules THP-1 par le PMA et l'activation des MDMs soit par une infection par BCG ou par la stimulation au lipopeptide est contrôlée en mesurant l'expression des antigènes à la surface cellulaire (CD80, CD40, ICAM-1) par cytométrie en flux. Pour cela, les cellules sont pré-incubées 20 min à 4°C avec la solution de blocage Fc-recepteur (Innovex Biosciences, Richmond, CA, USA) pour diminuer la fixation non spécifique d'immunoglobulines sur les cellules. La surface cellulaire est directement marquée pendant 40 min à 4°C dans du PBS/0.1% BSA avec des anticorps produits chez la souris conjugués à la fluorescéine dirigés contre le CD80 et le CD40 humains ou avec des anticorps couplés au PE dirigés contre ICAM-1 (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France). Deux isotypes contrôles IgG de souris couplés au FITC ou au PE (BD Biosciences) sont utilisés comme contrôle négatif. Les données sont obtenues grâce au cytofluorimètre en flux (FACSCalibur, BD Biosciences) et analysées avec le logiciel CellQuest (Mountain View, CA).

B – Détection des épitopes glucidiques par cytométrie en flux

Pour détecter les variations des épitopes glucidiques à la surface cellulaire durant l'infection par BCG et la stimulation au lipopeptide des macrophages, la fixation des lectines de plantes

conjuguées au FITC (SNA, MAA, LTA, UEA-I, PHA-L) est analysée par cytométrie en flux sur les cellules non traitées ou activées. La lectine SNA (*Sambucus nigra* agglutinin) reconnaît spécifiquement les résidus terminaux de Neu5Ac(α 2-6) alors que la MAA (*Maackia amurensis* agglutinin) fixe le Neu5Ac(α 2-3) (Geisler and Jarvis, 2011; Shibuya *et al.*, 1987). La LTA (*Lotus tetranologobus* agglutinin) et UEA-I (*Ulex europaeus I* agglutinin) préfèrent interagir avec le α -L-fucose (Sughii *et al.*, 1982; Yan *et al.*, 1997). La PHA-L (*Phaseolus vulgaris leukoagglutinin*) est une lectine spécifique des résidus de D-galactose et N-acétylgalactosamine (Schwarz *et al.*, 1996). Les cellules (250 000/puits) sont incubées avec ces lectines à 15 μ g/ml pendant 40 min à 4°C dans du PBS avec du calcium et du magnésium, contenant 0.05% de BSA prétraitée avec du metaperiodate de sodium. De plus, la fixation non spécifique des lectines LTA et UEA-I aux cellules est évaluée en présence de α L-fucose. Pour déterminer si les interactions entre la SNA, la MAA et les cellules stimulées ou non sont régulées par les motifs glucidiques, la glycoprotéine fétuine sialylée ou déglycosylée est préincubée avec la SNA ou la MAA avant l'incubation avec les cellules. Après lavage, l'analyse de la fluorescence est effectuée sur le FACSCalibur comme décrit préalablement. Le log de l'intensité de la fluorescence en unité arbitraire est représenté en fonction du nombre de cellule. Pour chaque lectine, le ratio de la moyenne de l'intensité de fluorescence des cellules stimulées par rapport aux cellules non traitées est déterminé à partir de trois expériences indépendantes réalisées en triplicat avec les THP-1 traitées au PMA et les MDMs obtenus à partir de sang de trois donneurs différents. Les significativités statistiques sont déterminées grâce au test t-Student (seules les valeurs de $p < 0.05$ sont considérées comme étant significatives).

Brièvement, 250 000 cellules sont pré-incubées 20 min à 4°C avec une solution de blocage Fc-receptor (Innovex Biosciences, Richmond, CA, USA) afin de diminuer la fixation non spécifique, lavées au PBS et incubées pendant 40 min à 4°C avec 7 μ l d'un anti-CD11c conjugué au FITC dans du PBS contenant 0.1% de BSA. Des IgGs contrôles de souris couplées au FITC (BD Biosciences) sont utilisées comme contrôle négatif. L'expression des épitopes Lewis X et Sialyl-Lewis X est déterminée durant la différenciation des cellules THP-1 par cytométrie en flux en utilisant un anticorps monoclonal anti CD15 humain BB515 (BD Biosciences) spécifique du motif Lewis X et un anticorps monoclonal anti sCD15 humain couplé à l'Alexa Fluor 488 (BD Biosciences) spécifique du motif Sialyl-Lewis X. La fixation non-spécifique des anticorps est mesurée grâce à l'utilisation d'isotype contrôles. Les données sont obtenues grâce au

cytomètre en flux (FACSCalibur, BD Biosciences) et analysées grâce au logiciel CellQuest (Mountain View, CA, USA).

V – Analyse des enzymes de la glycosylation par qPCR (Quantitative Real-Time-PCR)

Les ARNs totaux sont extraits à partir des cellules THP-1 (3×10^6) grâce au kit Nucleospin RNA II kit (Macherey-Nagel, Hoerd, France) selon les instructions du fabricant. Les concentrations en ARN sont déterminées grâce au spectrophotomètre NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, USA). Ensuite, la transcription inverse est effectuée comme décrit dans le kit (The Maxima[®] First Strand cDNA Synthesis Kit). Les séquences nucléotidiques (Eurogentec, Seraing, Belgium) utilisées comme amorces pour les réactions de PCRs sont rassemblées dans le Tableau 10. Les paires d'amorces ont été soit décrites précédemment soit sélectionnées grâce au logiciel primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) en collaboration avec le Dr Sophie Groux-Degroote de l'UGSF (équipe « Régulation de la glycosylation terminale »).

Les variations d'expression des différents gènes sont quantifiées par qPCR par le système Mx4000 Multiplex Quantitative PCR (Stratagene, La Jolla, CA, USA). Chaque réaction de PCR (25 μ l) contient 12.5 μ l de SYBRGreen (Thermo Fischer Scientific, Rockford, USA), 300 nM d'amorces et 4 μ l de cDNA (1 :40). L'amplification de l'ADN est réalisée grâce au programme suivant : une dénaturation initiale à 94°C pendant 30 s, 40 cycles d'amplification (dénaturation à 94°C pendant 30 s, hybridation à la température correspondante au T_m des amorces pendant 30 s et l'élongation à 72°C pendant 30 s) et une extension finale à 72°C pendant 5 min. Le T_m est de 60°C pour toutes les réactions de PCR sauf pour HPRT : 58°C. La fluorescence est mesurée à la fin de chaque cycle. Pour chaque paire d'amorces, la spécificité de l'amplification est vérifiée grâce aux courbes de dissociation, à la visualisation des produits amplifiés par électrophorèse sur gel d'agarose et par le séquençage des produits obtenus. L'efficacité de l'amplification est vérifiée grâce aux dilutions sériées des cDNA obtenus à partir des cellules THP-1 et est comprise entre 95 et 105%. Le gène codant HPRT (Hypoxanthine-guanine PhosphoRibosylTransferase) est utilisé pour normaliser l'expression des gènes d'intérêt. Toutes les expériences sont réalisées à partir de trois échantillons biologiques différents. La quantification est réalisée par la méthode décrite par Pfaffl (Pfaffl, 2001).

Amorces	Séquence 5' →3'	Référence
HPRT F	GCCAGACTTTGTTGGATTG	(Cazet <i>et al.</i> , 2010)
HPRT R	CTCTCATCTTAGGCTTTGTATTTTG	
ST3GAL4 F	ATAAGAAGCGGGTGCGAAAGGG	(García-Vallejo <i>et al.</i> , 2006)
ST3GAL4 R	TCCGTGGCTGTTGCATTGGC	
ST3GAL5 F	ATCGGTGTCATTGCCGTTGT	(Cazet <i>et al.</i> , 2010)
ST3GAL5 R	TTCATAGCAGCCATGCATTGA	
B4GALNT1 F	CAGCGCTCTAGTCACGATTGC'	(Cazet <i>et al.</i> , 2010)
B4GALNT1 R	CCACGGTAACCGTTGGGTAG	
GnTV F	GATGTGCTTTTCTGAATCCCAAGT	(García-Vallejo <i>et al.</i> , 2006)
GnTV R	GGGACTTGCTGACCATGTTT	
ST6GAL1 F	CATCCAAGCGCAAGACTGACG	(Groux-Degroote <i>et al.</i> , 2008a)
ST6GAL1 R	TGTGCCCTGGTTGAGATGCTTC	
FUT4 F	GAGCTACGCTGTCCACATCACC	(Groux-Degroote <i>et al.</i> , 2008a)
FUT4 R	CAGCTGGCCAAGTTCCGTATG	
FUT7 F	ACCACCACTACCTATCCAA	(Groux-Degroote <i>et al.</i> , 2008a)
FUT7 R	GTGAGTGGAGGGATGTAGA	
FUT8 F	TCTTCATCCCCGTCCTCCA	(García-Vallejo <i>et al.</i> , 2006)
FUT8 R	GAGACACCCACCACACTGCA	
β4GalT1 F	AACTTGACCTCGGTCCCAGTGC	(García-Vallejo <i>et al.</i> , 2006)
β4GalT1 R	GGCCGCCATCTTCACATTTG	
βGalT3 F	TAGTGGGTCTGTGTCGGTGTC	(García-Vallejo <i>et al.</i> , 2006)
βGalT3 R	AGGCACAATGATGGCTGTTCG	
MGAT1 F	GGTGATTCCCATCCTGGTCAT	(García-Vallejo <i>et al.</i> , 2006)
MGAT1 R	TCAGCCGAGGGCCGATA	
MGAT2 F	TCCGTTCTGCAGGTGTTT	(García-Vallejo <i>et al.</i> , 2006)
MGAT2 R	CAATCTCTAGGGTCACTACCTGGAA	
MGAT4A F	CTGTGGAAGTTTTGCCTTTAAGAG	(García-Vallejo <i>et al.</i> , 2006)
MGAT4A R	TGAAATGGGATTGAGACTTGGA	
NEU1 F	TGTGACCTTCGACCCTGAGC	(Cross <i>et al.</i> , 2012)
NEU1 R	TCGCAGGGTCAGGTTCACTC	

Tableau 10 - Séquences des différentes amorces utilisées en qPCR.

Références

A

- Afroun, S., Tenu, J.P., Lemaire, G., 1988. Modifications of glycosylation patterns in macrophages upon activation. *Biochim. Biophys. Acta* 971, 137–147.
- Albright, C.F., Robbins, R.W., 1990. The sequence and transcript heterogeneity of the yeast gene ALG1, an essential mannosyltransferase involved in N-glycosylation. *J. Biol. Chem.* 265, 7042–7049.
- Alexopoulou, L., Holt, A.C., Medzhitov, R., Flavell, R.A., 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3. *Nature* 413, 732–738. doi:10.1038/35099560
- Alley, W.R., Novotny, M.V., 2010. Glycomic Analysis of Sialic Acid Linkages in Glycans Derived from Blood Serum Glycoproteins. *J. Proteome Res.* 9, 3062–3072. doi:10.1021/pr901210r
- Ando, M., Shoji, T., Tu, W., Higuchi, H., Nishijima, K., Iijima, S., 2014. Lectin-dependent localization of cell surface sialic acid-binding lectin Siglec-9. *Cytotechnology* 67, 601–608. doi:10.1007/s10616-014-9691-6
- Ando, M., Tu, W., Nishijima, K., Iijima, S., 2008. Siglec-9 enhances IL-10 production in macrophages via tyrosine-based motifs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 369, 878–883. doi:10.1016/j.bbrc.2008.02.111
- Appelmelk, B.J., van Die, I., van Vliet, S.J., Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E., Geijtenbeek, T.B.H., van Kooyk, Y., 2003. Cutting edge: carbohydrate profiling identifies new pathogens that interact with dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin on dendritic cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 170, 1635–1639.
- Arango Duque, G., Descoteaux, A., 2014. Macrophage Cytokines: Involvement in Immunity and Infectious Diseases. *Front. Immunol.* 5. doi:10.3389/fimmu.2014.00491
- Asa, D., Raycroft, L., Ma, L., Aeed, P.A., Kaytes, P.S., Elhammer, A.P., Geng, J.G., 1995. The P-selectin glycoprotein ligand functions as a common human leukocyte ligand for P- and E-selectins. *J. Biol. Chem.* 270, 11662–11670.
- Astarie-Dequeker, C., N'Diaye, E.-N., Cabec, V.L., Rittig, M.G., Prandi, J., Maridonneau-Parini, I., 1999. The Mannose Receptor Mediates Uptake of Pathogenic and Nonpathogenic Mycobacteria and Bypasses Bactericidal Responses in Human Macrophages. *Infect. Immun.* 67, 469–477.
- Astarie-Dequeker, C., Nigou, J., Passemar, C., Guilhot, C., 2010. The role of mycobacterial lipids in host pathogenesis. *Drug Discov. Today Dis. Mech.* 7, e33–e41. doi:10.1016/j.ddmec.2010.09.003
- Auwerx, J., 1991. The human leukemia cell line, THP-1: a multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. *Experientia* 47, 22–31.

B

- Baldus, S.E., Thiele, J., Park, Y.O., Hanisch, F.G., Bara, J., Fischer, R., 1996. Characterization of the binding specificity of *Anguilla anguilla* agglutinin (AAA) in comparison to *Ulex europaeus* agglutinin I (UEA-I). *Glycoconj. J.* 13, 585–590.
- Banchereau, J., Steinman, R.M., 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245–252. doi:10.1038/32588
- Barbosa, J.A., Santos-Aguado, J., Mentzer, S.J., Strominger, J.L., Burakoff, S.J., Biro, P.A., 1987. Site-directed mutagenesis of class I HLA genes. Role of glycosylation in surface expression and functional recognition. *J. Exp. Med.* 166, 1329–1350. doi:10.1084/jem.166.5.1329
- Barel, M., Harduin-Lepers, A., Portier, L., Slomianny, M.-C., Charbit, A., 2016. Host glycosylation pathways and the unfolded protein response contribute to the infection by *Francisella*: Glycosylation and UPR in *Francisella* infection. *Cell. Microbiol.* doi:10.1111/cmi.12614
- Barthel, S.R., Wiese, G.K., Cho, J., Opperman, M.J., Hays, D.L., Siddiqui, J., Pienta, K.J., Furie, B., Dimitroff, C.J., 2009. Alpha 1,3 fucosyltransferases are master regulators of prostate cancer cell trafficking. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 19491–19496. doi:10.1073/pnas.0906074106
- Barton, G.M., Kagan, J.C., Medzhitov, R., 2006. Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nat. Immunol.* 7, 49–56. doi:10.1038/ni1280
- Basu, J., Shin, D.-M., Jo, E.-K., 2012. Mycobacterial signaling through toll-like receptors. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2. doi:10.3389/fcimb.2012.00145
- Bax, M., Garcia-Vallejo, J.J., Jang-Lee, J., North, S.J., Gilmartin, T.J., Hernandez, G., Crocker, P.R., Leffler, H., Head, S.R., Haslam, S.M., Dell, A., van Kooyk, Y., 2007. Dendritic Cell Maturation Results in Pronounced Changes in Glycan Expression Affecting Recognition by Siglecs and Galectins. *J. Immunol.* 179, 8216–8224. doi:10.4049/jimmunol.179.12.8216
- Belanger, A.E., Besra, G.S., Ford, M.E., Mikusová, K., Belisle, J.T., Brennan, P.J., Inamine, J.M., 1996. The embAB genes of *Mycobacterium avium* encode an arabinosyl transferase involved in cell wall arabinan biosynthesis that is the target for the antimycobacterial drug ethambutol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 11919–11924.
- Bickel, T., Lehle, L., Schwarz, M., Aebi, M., Jakob, C.A., 2005. Biosynthesis of Lipid-linked Oligosaccharides in *Saccharomyces cerevisiae* Alg13p AND Alg14p FORM A COMPLEX REQUIRED FOR THE FORMATION OF glcnac2-PP-DOLICHOL. *J. Biol. Chem.* 280, 34500–34506. doi:10.1074/jbc.M506358200
- Birch, H.L., Alderwick, L.J., Appelmelk, B.J., Maaskant, J., Bhatt, A., Singh, A., Nigou, J., Eggeling, L., Geurtsen, J., Besra, G.S., 2010. A truncated lipoglycan from mycobacteria with altered immunological properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 2634–2639. doi:10.1073/pnas.0915082107
- Biswas, S.K., Mantovani, A., 2010. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat. Immunol.* 11, 889–896. doi:10.1038/ni.1937

Blanc, L., Gilleron, M., Prandi, J., Song, O., Jang, M.-S., Gicquel, B., Drocourt, D., Neyrolles, O., Brodin, P., Tiraby, G., Vercellone, A., Nigou, J., 2017. Mycobacterium tuberculosis inhibits human innate immune responses via the production of TLR2 antagonist glycolipids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 114, 11205–11210. doi:10.1073/pnas.1707840114

Botos, I., Segal, D.M., Davies, D.R., 2011. The Structural Biology of Toll-Like Receptors. *Struct. Lond. Engl.* 19, 447–459. doi:10.1016/j.str.2011.02.004

Bovijn, C., Ulrichs, P., De Smet, A.-S., Catteuw, D., Beyaert, R., Tavernier, J., Peelman, F., 2012. Identification of interaction sites for dimerization and adapter recruitment in Toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain of Toll-like receptor 4. *J. Biol. Chem.* 287, 4088–4098. doi:10.1074/jbc.M111.282350

Brenner, D., Blaser, H., Mak, T.W., 2015. Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 362–374. doi:10.1038/nri3834

Brightbill, H.D., Libraty, D.H., Krutzik, S.R., Yang, R.-B., Belisle, J.T., Bleharski, J.R., Maitland, M., Norgard, M.V., Plevy, S.E., Smale, S.T., Brennan, P.J., Bloom, B.R., Godowski, P.J., Modlin, R.L., 1999. Host Defense Mechanisms Triggered by Microbial Lipoproteins Through Toll-Like Receptors. *Science* 285, 732–736. doi:10.1126/science.285.5428.732

Brockhausen, I., 2014. Crossroads between Bacterial and Mammalian Glycosyltransferases. *Front. Immunol.* 5. doi:10.3389/fimmu.2014.00492

Brockhausen, I., Hull, E., Hindsgaul, O., Schachter, H., Shah, R.N., Michnick, S.W., Carver, J.P., 1989. Control of glycoprotein synthesis. Detection and characterization of a novel branching enzyme from hen oviduct, UDP-N-acetylglucosamine:GlcNAc beta 1-6 (GlcNAc beta 1-2)Man alpha-R (GlcNAc to Man) beta-4-N-acetylglucosaminyltransferase VI. *J. Biol. Chem.* 264, 11211–11221.

Brosch, R., Gordon, S.V., Buchrieser, C., Pym, A.S., Garnier, T., Cole, S.T., 2000. Comparative Genomics Uncovers Large Tandem Chromosomal Duplications in Mycobacterium Bovis BCG Pasteur. *Yeast Chichester Engl.* 17, 111–123. doi:10.1002/1097-0061(20000630)17:2<111::AID-YEA17>3.0.CO;2-G

Brosch, R., Gordon, S.V., Marmiesse, M., Brodin, P., Buchrieser, C., Eiglmeier, K., Garnier, T., Gutierrez, C., Hewinson, G., Kremer, K., Parsons, L.M., Pym, A.S., Samper, S., Soolingen, D. van, Cole, S.T., 2002. A new evolutionary scenario for the Mycobacterium tuberculosis complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 3684–3689. doi:10.1073/pnas.052548299

Bulut, Y., Michelsen, K.S., Hayrapetian, L., Naiki, Y., Spallek, R., Singh, M., Arditi, M., 2005. Mycobacterium Tuberculosis Heat Shock Proteins Use Diverse Toll-like Receptor Pathways to Activate Pro-inflammatory Signals. *J. Biol. Chem.* 280, 20961–20967. doi:10.1074/jbc.M411379200

C

Cabral, M.G., Piteira, A.R., Silva, Z., Ligeiro, D., Brossmer, R., Videira, P.A., 2010. Human dendritic cells contain cell surface sialyltransferase activity. *Immunol. Lett.* 131, 89–96. doi:10.1016/j.imlet.2010.02.009

- Cabral, M.G., Silva, Z., Ligeiro, D., Seixas, E., Crespo, H., Carrascal, M.A., Silva, M., Piteira, A.R., Paixão, P., Lau, J.T., Videira, P.A., 2013. The phagocytic capacity and immunological potency of human dendritic cells is improved by α 2,6-sialic acid deficiency. *Immunology* 138, 235–245. doi:10.1111/imm.12025
- Call, M.E., Pyrdol, J., Wiedmann, M., Wucherpfennig, K.W., 2002. The Organizing Principle in the Formation of the T Cell Receptor-CD3 Complex. *Cell* 111, 967–979. doi:10.1016/S0092-8674(02)01194-7
- Cambi, A., Netea, M.G., Mora-Montes, H.M., Gow, N.A.R., Hato, S.V., Lowman, D.W., Kullberg, B.-J., Torensma, R., Williams, D.L., Figdor, C.G., 2008. Dendritic cell interaction with *Candida albicans* critically depends on N-linked mannan. *J. Biol. Chem.* 283, 20590–20599. doi:10.1074/jbc.M709334200
- Cao, H., Walton, J.D., Brumm, P., Phillips, G.N., 2014. Structure and Substrate Specificity of a Eukaryotic Fucosidase from *Fusarium graminearum*. *J. Biol. Chem.* 289, 25624–25638. doi:10.1074/jbc.M114.583286
- Cao, W., 2009. Molecular Characterization of Human Plasmacytoid Dendritic Cells. *J. Clin. Immunol.* 29, 257–264. doi:10.1007/s10875-009-9284-x
- Caramelo, J.J., Parodi, A.J., 2008. Getting In and Out from Calnexin/Calreticulin Cycles. *J. Biol. Chem.* 283, 10221–10225. doi:10.1074/jbc.R700048200
- Caruso, R., Warner, N., Inohara, N., Núñez, G., 2014. NOD1 and NOD2: Signaling, Host Defense, and Inflammatory Disease. *Immunity* 41, 898–908. doi:10.1016/j.immuni.2014.12.010
- Carvalho, A.S., Harduin-Lepers, A., Magalhães, A., Machado, E., Mendes, N., Costa, L.T., Matthiesen, R., Almeida, R., Costa, J., Reis, C.A., 2010. Differential expression of α -2,3-sialyltransferases and α -1,3/4-fucosyltransferases regulates the levels of sialyl Lewis a and sialyl Lewis x in gastrointestinal carcinoma cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42, 80–89. doi:10.1016/j.biocel.2009.09.010
- Cazet, A., Lefebvre, J., Adriaenssens, E., Julien, S., Bobowski, M., Grigoriadis, A., Tutt, A., Tulasne, D., Le Bourhis, X., Delannoy, P., 2010. GD3 Synthase Expression Enhances Proliferation and Tumor Growth of MDA-MB-231 Breast Cancer Cells through c-Met Activation. *Mol. Cancer Res.* 8, 1526–1535. doi:10.1158/1541-7786.MCR-10-0302
- Chadban, S.J., Tesch, G.H., Foti, R., Lan, H.Y., Atkins, R.C., Nikolic-Paterson, D.J., 1998. Interleukin-10 differentially modulates MHC class II expression by mesangial cells and macrophages in vitro and in vivo. *Immunology* 94, 72–78.
- Chanput, W., Mes, J.J., Wichers, H.J., 2014. THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach. *Int. Immunopharmacol.*
- Chavan, M., Lennarz, W., 2006. The molecular basis of coupling of translocation and N-glycosylation. *Trends Biochem. Sci.*, SPECIAL ISSUE: CELEBRATING 30 YEARS OF TIBS 31, 17–20. doi:10.1016/j.tibs.2005.11.010
- Chen, G.-Y., Brown, N.K., Wu, W., Khedri, Z., Yu, H., Chen, X., Vlekkert, D. van de, D’Azzo, A., Zheng, P., Liu, Y., 2014. Broad and direct interaction between TLR and Siglec families of pattern recognition receptors and its regulation by Neu1. *eLife* 3, e04066. doi:10.7554/eLife.04066

- Chen, H.-L., Li, C.F., Grigorian, A., Tian, W., Demetriou, M., 2009. T Cell Receptor Signaling Co-regulates Multiple Golgi Genes to Enhance N-Glycan Branching. *J. Biol. Chem.* 284, 32454–32461. doi:10.1074/jbc.M109.023630
- Cheng, T.-C., Tu, S.-H., Chen, L.-C., Chen, M.-Y., Chen, W.-Y., Lin, Y.-K., Ho, C.-T., Lin, S.-Y., Wu, C.-H., Ho, Y.-S., 2015. Down-regulation of α -L-fucosidase 1 expression confers inferior survival for triple-negative breast cancer patients by modulating the glycosylation status of the tumor cell surface. *Oncotarget* 6, 21283–21300.
- Choi, H.-J., Park, Y.-G., Kim, C.-H., 2007. Lactosylceramide α 2,3-sialyltransferase is induced via a PKC/ERK/CREB-dependent pathway in K562 human leukemia cells. *Mol. Cells* 23, 138–144.
- Chung, A.W., Sieling, P.A., Schenk, M., Teles, R.M.B., Krutzik, S.R., Hsu, D.K., Liu, F.-T., Sarno, E.N., Rea, T.H., Stenger, S., Modlin, R.L., Lee, D.J., 2013. Galectin-3 Regulates the Innate Immune Response of Human Monocytes. *J. Infect. Dis.* 207, 947–956. doi:10.1093/infdis/jis920
- Cipollo, J.F., Trimble, R.B., Chi, J.H., Yan, Q., Dean, N., 2001. The Yeast ALG11 Gene Specifies Addition of the Terminal α 1,2-Man to the Man5GlcNAc2-PP-dolicholN-Glycosylation Intermediate Formed on the Cytosolic Side of the Endoplasmic Reticulum. *J. Biol. Chem.* 276, 21828–21840. doi:10.1074/jbc.M010896200
- Ciucanu, Ionel, Kerek, F., 1984. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydr. Res.* 131, 209–217.
- Ciucanu, I, Kerek, F., 1984. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydr. Res.* 131, 209–217. doi:10.1016/0008-6215(84)85242-8
- Clarke, J.L., Watkins, W.M., 1996. 1,3-L-Fucosyltransferase Expression in Developing Human Myeloid Cells ANTIGENIC, ENZYMATIC, AND mRNA ANALYSES. *J. Biol. Chem.* 271, 10317–10328. doi:10.1074/jbc.271.17.10317
- Collin, M., McGovern, N., Haniffa, M., 2013. Human dendritic cell subsets. *Immunology* 140, 22–30. doi:10.1111/imm.12117
- Colomb, F., Vidal, O., Bobowski, M., Krzewinski-Recchi, M.-A., Harduin-Lepers, A., Mensier, E., Jaillard, S., Lafitte, J.-J., Delannoy, P., Groux-Degroote, S., 2014. TNF induces the expression of the sialyltransferase ST3Gal IV in human bronchial mucosa via MSK1/2 protein kinases and increases FliD/sialyl-Lewisx-mediated adhesion of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem. J.* 457, 79–87. doi:10.1042/BJ20130989
- Cooling, L., 2015. Blood Groups in Infection and Host Susceptibility. *Clin. Microbiol. Rev.* 28, 801–870. doi:10.1128/CMR.00109-14
- Correia, J. da S., Ulevitch, R.J., 2002. MD-2 and TLR4 N-Linked Glycosylations Are Important for a Functional Lipopolysaccharide Receptor. *J. Biol. Chem.* 277, 1845–1854. doi:10.1074/jbc.M109910200

Cross, A.S., Hyun, S.W., Miranda-Ribera, A., Feng, C., Liu, A., Nguyen, C., Zhang, L., Luzina, I.G., Atamas, S.P., Twaddell, W.S., Guang, W., Lillehoj, E.P., Puché, A.C., Huang, W., Wang, L.-X., Passaniti, A., Goldblum, S.E., 2012. NEU1 and NEU3 sialidase activity expressed in human lung microvascular endothelia: NEU1 restrains endothelial cell migration, whereas NEU3 does not. *J. Biol. Chem.* 287, 15966–15980. doi:10.1074/jbc.M112.346817

Cui, W., Joshi, N.S., Liu, Y., Meng, H., Kleinstein, S.H., Kaech, S.M., 2014. TLR4 Ligands Lipopolysaccharide and Monophosphoryl Lipid A Differentially Regulate Effector and Memory CD8⁺ T Cell Differentiation. *J. Immunol.* 192, 4221–4232. doi:10.4049/jimmunol.1302569

Cummings, R.D., 2009. The repertoire of glycan determinants in the human glycome. *Mol. Biosyst.* 5, 1087–1104. doi:10.1039/B907931A

Cummings, R.D., Etzler, M.E., 2009. Antibodies and Lectins in Glycan Analysis, in: Varki, A., Cummings, R.D., Esko, J.D., Freeze, H.H., Stanley, P., Bertozzi, C.R., Hart, G.W., Etzler, M.E. (Eds.), *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY).

Curtis, M.M., Way, S.S., 2009. Interleukin-17 in host defence against bacterial, mycobacterial and fungal pathogens. *Immunology* 126, 177–185. doi:10.1111/j.1365-2567.2008.03017.x

D

Dahmen, A.-C., Fergen, M.-T., Laurini, C., Schmitz, B., Loke, I., Thaysen-Andersen, M., Diestel, S., 2015. Paucimannosidic glycoepitopes are functionally involved in proliferation of neural progenitor cells in the subventricular zone. *Glycobiology* 25, 869–880. doi:10.1093/glycob/cwv027

D'Alessio, C., Caramelo, J.J., Parodi, A.J., 2010. UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase-glucosidase II, the ying-yang of the ER quality control. *Semin. Cell Dev. Biol., Quality control in the endoplasmic reticulum* 21, 491–499. doi:10.1016/j.semcdb.2009.12.014

Dam, T.K., Brewer, C.F., 2010. Lectins as pattern recognition molecules: The effects of epitope density in innate immunity. *Glycobiology* 20, 270–279. doi:10.1093/glycob/cwp186

Dao, D.N., Kremer, L., Guerardel, Y., Molano, A., Jacobs, W.R., Porcelli, S.A., Briken, V., 2004. Mycobacterium tuberculosis Lipomannan Induces Apoptosis and Interleukin-12 Production in Macrophages. *Infect. Immun.* 72, 2067–2074. doi:10.1128/IAI.72.4.2067-2074.2004

Delannoy, C.P., Rombouts, Y., Groux-Degroote, S., Holst, S., Coddeville, B., Harduin-Lepers, A., Wuhrer, M., Ellass-Rochard, E., Guérardel, Y., 2016. Glycosylation Changes Triggered by the Differentiation of Monocytic THP-1 Cell Line into Macrophages. *J. Proteome Res.* doi:10.1021/acs.jproteome.6b00161

Delmotte, P., Degroote, S., Lafitte, J.-J., Lamblin, G., Perini, J.-M., Roussel, P., 2002. Tumor Necrosis Factor α Increases the Expression of Glycosyltransferases and Sulfotransferases Responsible for the Biosynthesis of Sialylated and/or Sulfated Lewis x Epitopes in the Human Bronchial Mucosa. *J. Biol. Chem.* 277, 424–431. doi:10.1074/jbc.M109958200

- Demetriou, M., Granovsky, M., Quaggin, S., Dennis, J.W., 2001. Negative regulation of T-cell activation and autoimmunity by Mgat5 N-glycosylation. *Nature* 409, 733–739. doi:10.1038/35055582
- Desgrosellier, J.S., Cheresh, D.A., 2010. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Cancer* 10, 9–22. doi:10.1038/nrc2748
- Dias, A.M., Dourado, J., Lago, P., Cabral, J., Marcos-Pinto, R., Salgueiro, P., Almeida, C.R., Carvalho, S., Fonseca, S., Lima, M., Vilanova, M., Dinis-Ribeiro, M., Reis, C.A., Pinho, S.S., 2014. Dysregulation of T cell receptor N-glycosylation: a molecular mechanism involved in ulcerative colitis. *Hum. Mol. Genet.* 23, 2416–2427. doi:10.1093/hmg/ddt632
- Diaz-Silvestre, H., Espinosa-Cueto, P., Sanchez-Gonzalez, A., Esparza-Ceron, M.A., Pereira-Suarez, A.L., Bernal-Fernandez, G., Espitia, C., Mancilla, R., 2005. The 19-kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis* is a major adhesin that binds the mannose receptor of THP-1 monocytic cells and promotes phagocytosis of mycobacteria. *Microb. Pathog.* 39, 97–107. doi:10.1016/j.micpath.2005.06.002
- DiCioccio, R.A., Barlow, J.J., Matta, K.L., 1982. Substrate specificity and other properties of alpha-L-fucosidase from human serum. *J. Biol. Chem.* 257, 714–718.
- Diebold, S.S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S., Reis e Sousa, C., 2004. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 303, 1529–1531. doi:10.1126/science.1093616
- Domínguez-Soto, A., Sierra-Filardi, E., Puig-Kröger, A., Pérez-Maceda, B., Gómez-Aguado, F., Corcuera, M.T., Sánchez-Mateos, P., Corbí, A.L., 2011. Dendritic Cell-Specific ICAM-3–Grabbing Nonintegrin Expression on M2-Polarized and Tumor-Associated Macrophages Is Macrophage-CSF Dependent and Enhanced by Tumor-Derived IL-6 and IL-10. *J. Immunol.* 186, 2192–2200. doi:10.4049/jimmunol.1000475
- Domon, B., Costello, C.E., 1988. A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates. *Glycoconj. J.* 5, 397–409.
- Döring, Y., Noels, H., Mandl, M., Kramp, B., Neideck, C., Lievens, D., Drechsler, M., Megens, R.T.A., Tilstam, P.V., Langer, M., Hartwig, H., Theelen, W., Marth, J.D., Sperandio, M., Soehnlein, O., Weber, C., 2014. Deficiency of the sialyltransferase St3Gal4 reduces Ccl5-mediated myeloid cell recruitment and arrest: short communication. *Circ. Res.* 114, 976–981. doi:10.1161/CIRCRESAHA.114.302426
- Dotz, V., Wuhrer, M., 2016. Histo-blood group glycans in the context of personalized medicine. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.*, Glycans in personalised medicine 1860, 1596–1607. doi:10.1016/j.bbagen.2015.12.026
- Dowling, J.K., Mansell, A., 2016. Toll-like receptors: the swiss army knife of immunity and vaccine development. *Clin. Transl. Immunol.* 5, e85. doi:10.1038/cti.2016.22
- Drolez, A., Vandenhaute, E., Delannoy, C.P., Dewald, J.H., Gosselet, F., Cecchelli, R., Julien, S., Dehouck, M.-P., Delannoy, P., Mysiorek, C., 2016. ST6GALNAC5 Expression Decreases the Interactions between Breast Cancer Cells and the Human Blood-Brain Barrier. *Int. J. Mol. Sci.* 17. doi:10.3390/ijms17081309

Dufour, F., Rattier, T., Shirley, S., Picarda, G., Constantinescu, A.A., Morlé, A., Zakaria, A.B., Marcion, G., Causse, S., Szegezdi, E., Zajonc, D.M., Seigneuric, R., Guichard, G., Gharbi, T., Picaud, F., Herlem, G., Garrido, C., Schneider, P., Benedict, C.A., Micheau, O., 2017. N-glycosylation of mouse TRAIL-R and human TRAIL-R1 enhances TRAIL-induced death. *Cell Death Differ.* 24, 500–510. doi:10.1038/cdd.2016.150

Dunnen, J. den, Gringhuis, S.I., Geijtenbeek, T.B.H., 2009. Innate signaling by the C-type lectin DC-SIGN dictates immune responses. *Cancer Immunol. Immunother.* 58, 1149–1157. doi:10.1007/s00262-008-0615-1

Dziarski, R., Gupta, D., 2005. Staphylococcus aureus peptidoglycan is a toll-like receptor 2 activator: a reevaluation. *Infect. Immun.* 73, 5212–5216. doi:10.1128/IAI.73.8.5212-5216.2005

E

Eckert, V., Blank, M., Mazhari-Tabrizi, R., Mumberg, D., Funk, M., Schwarz, R.T., 1998. Cloning and functional expression of the human GlcNAc-1-P transferase, the enzyme for the committed step of the dolichol cycle, by heterologous complementation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Glycobiology* 8, 77–85. doi:10.1093/glycob/8.1.77

Edwards, J.P., Zhang, X., Frauwirth, K.A., Mosser, D.M., 2006. Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. *J. Leukoc. Biol.* 80, 1298–1307. doi:10.1189/jlb.0406249

Ehlers, S., 2010. DC-SIGN and mannosylated surface structures of *Mycobacterium tuberculosis*: a deceptive liaison. *Eur. J. Cell Biol., Glycostructures in Biological Systems - Synthesis and Function* 89, 95–101. doi:10.1016/j.ejcb.2009.10.004

Elass-Rochard, E., Rombouts, Y., Coddeville, B., Maes, E., Blervaque, R., Hot, D., Kremer, L., Guerardel, Y., 2012a. Structural Determination and Toll-like Receptor 2-dependent Proinflammatory Activity of Dimycolyl-diarabino-glycerol from *Mycobacterium marinum*. *J. Biol. Chem.* 287, 34432–34444. doi:10.1074/jbc.M112.378083

Elass-Rochard, E., Rombouts, Y., Coddeville, B., Maes, E., Blervaque, R., Hot, D., Kremer, L., Guerardel, Y., 2012b. Structural Determination and Toll-like Receptor 2-dependent Proinflammatory Activity of Dimycolyl-diarabino-glycerol from *Mycobacterium marinum*. *J. Biol. Chem.* 287, 34432–34444. doi:10.1074/jbc.M112.378083

Ellies, L.G., Sperandio, M., Underhill, G.H., Yousif, J., Smith, M., Priatel, J.J., Kansas, G.S., Ley, K., Marth, J.D., 2002. Sialyltransferase specificity in selectin ligand formation. *Blood* 100, 3618–3625. doi:10.1182/blood-2002-04-1007

Erbacher, A., Gieseke, F., Handgretinger, R., Müller, I., 2009. Dendritic cells: Functional aspects of glycosylation and lectins. *Hum. Immunol., Generation, Phenotype and Functional Characterization of Tolerogenic Dendritic Cells and Their Clinical Applications* 70, 308–312. doi:10.1016/j.humimm.2009.02.005

Ezawa, I., Sawai, Y., Kawase, T., Okabe, A., Tsutsumi, S., Ichikawa, H., Kobayashi, Y., Tashiro, F., Namiki, H., Kondo, T., Semba, K., Aburatani, H., Taya, Y., Nakagama, H., Ohki, R., 2016. Novel p53 target gene FUCA1 encodes a fucosidase and regulates growth and survival of cancer cells. *Cancer Sci.* 107, 734–745. doi:10.1111/cas.12933

F

Fan, Y.-Y., Yu, S.-Y., Ito, H., Kameyama, A., Sato, T., Lin, C.-H., Yu, L.-C., Narimatsu, H., Khoo, K.-H., 2008. Identification of Further Elongation and Branching of Dimeric Type 1 Chain on Lactosylceramides from Colonic Adenocarcinoma by Tandem Mass Spectrometry Sequencing Analyses. *J. Biol. Chem.* 283, 16455–16468. doi:10.1074/jbc.M707274200

Fang, H., Wu, Y., Huang, X., Wang, W., Ang, B., Cao, X., Wan, T., 2011. Toll-like Receptor 4 (TLR4) Is Essential for Hsp70-like Protein 1 (HSP70L1) to Activate Dendritic Cells and Induce Th1 Response. *J. Biol. Chem.* 286, 30393–30400. doi:10.1074/jbc.M111.266528

Farhat, K., Riekenberg, S., Heine, H., Debarry, J., Lang, R., Mages, J., Buwitt-Beckmann, U., Röschmann, K., Jung, G., Wiesmüller, K.-H., Ulmer, A.J., 2008. Heterodimerization of TLR2 with TLR1 or TLR6 expands the ligand spectrum but does not lead to differential signaling. *J. Leukoc. Biol.* 83, 692–701. doi:10.1189/jlb.0807586

Faria, S., Joao, I., Jordao, L., 2015. General Overview on Nontuberculous Mycobacteria, Biofilms, and Human Infection. *J. Pathog.* 2015. doi:10.1155/2015/809014

Ferris, S.P., Kodali, V.K., Kaufman, R.J., 2014. Glycoprotein folding and quality-control mechanisms in protein-folding diseases. *Dis. Model. Mech.* 7, 331–341. doi:10.1242/dmm.014589

Fiete, D.J., Beranek, M.C., Baenziger, J.U., 1998. A cysteine-rich domain of the “mannose” receptor mediates GalNAc-4-SO₄ binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 2089–2093.

Frank, C.G., Sanyal, S., Rush, J.S., Waechter, C.J., Menon, A.K., 2008. Does Rft1 flip an N-glycan lipid precursor? *Nature* 454, E3–E4. doi:10.1038/nature07165

Fratti, R.A., Chua, J., Vergne, I., Deretic, V., 2003. Mycobacterium tuberculosis glycosylated phosphatidylinositol causes phagosome maturation arrest. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 5437–5442. doi:10.1073/pnas.0737613100

Frohman, M., Cowing, C., 1985. Presentation of antigen by B cells: functional dependence on radiation dose, interleukins, cellular activation, and differential glycosylation. *J. Immunol.* 134, 2269–2275.

Fukuda, M., Rutishauser, U., Schnaar, R.L., 2005. *Neuroglycobiology*. Oxford University Press. doi:10.1093/acprof:oso/9780198525387.001.0001

G

Gadhoom, S.Z., Sackstein, R., 2008. CD15 expression in human myeloid cell differentiation is regulated by sialidase activity. *Nat. Chem. Biol.* 4, 751–757. doi:10.1038/nchembio.116

- Gagliardi, M.C., Teloni, R., Giannoni, F., Pardini, M., Sargentini, V., Brunori, L., Fattorini, L., Nisini, R., 2005. Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guerin infects DC-SIGN- dendritic cell and causes the inhibition of IL-12 and the enhancement of IL-10 production. *J. Leukoc. Biol.* 78, 106–113. doi:10.1189/jlb.0105037
- Galván-Peña, S., O’Neill, L.A.J., 2014. Metabolic Reprograming in Macrophage Polarization. *Front. Immunol.* 5. doi:10.3389/fimmu.2014.00420
- Gao, X.-D., Nishikawa, A., Dean, N., 2004. Physical interactions between the Alg1, Alg2, and Alg11 mannosyltransferases of the endoplasmic reticulum. *Glycobiology* 14, 559–570. doi:10.1093/glycob/cwh072
- García-Vallejo, J.J., Van Dijk, W., Van Het Hof, B., Van Die, I., Engelse, M.A., Van Hinsbergh, V.W.M., Gringhuis, S.I., 2006. Activation of human endothelial cells by tumor necrosis factor- α results in profound changes in the expression of glycosylation-related genes. *J. Cell. Physiol.* 206, 203–210. doi:10.1002/jcp.20458
- García-Vallejo, J.J., van Liempt, E., da Costa Martins, P., Beckers, C., van het Hof, B., Gringhuis, S.I., Zwaginga, J.-J., van Dijk, W., Geijtenbeek, T.B.H., van Kooyk, Y., van Die, I., 2008. DC-SIGN mediates adhesion and rolling of dendritic cells on primary human umbilical vein endothelial cells through LewisY antigen expressed on ICAM-2. *Mol. Immunol.* 45, 2359–2369. doi:10.1016/j.molimm.2007.11.001
- Gassen, U., Kelm, S., Schauer, R., 1998. Differential gene expression of a human α 2,3-sialyltransferase in leukaemic cell lines and leucocytes. *FEBS Lett.* 427, 91–95.
- Gasteiger, G., Rudensky, A.Y., 2014. Interactions between innate and adaptive lymphocytes. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 631–639. doi:10.1038/nri3726
- Gaur, R.L., Ren, K., Blumenthal, A., Bhamidi, S., Gibbs, S., Jackson, M., Zare, R.N., Ehrt, S., Ernst, J.D., Banaei, N., 2014. LprG-Mediated Surface Expression of Lipoarabinomannan Is Essential for Virulence of Mycobacterium tuberculosis. *PLOS Pathog.* 10, e1004376. doi:10.1371/journal.ppat.1004376
- Geijtenbeek, T.B., Kwon, D.S., Torensma, R., van Vliet, S.J., van Duijnhoven, G.C., Middel, J., Cornelissen, I.L., Nottet, H.S., KewalRamani, V.N., Littman, D.R., Figdor, C.G., van Kooyk, Y., 2000. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* 100, 587–597.
- Geijtenbeek, T.B.H., Torensma, R., Vliet, S.J. van, Duijnhoven, G.C.F. van, Adema, G.J., Kooyk, Y. van, Figdor, C.G., 2000. Identification of DC-SIGN, a Novel Dendritic Cell-Specific ICAM-3 Receptor that Supports Primary Immune Responses. *Cell* 100, 575–585. doi:10.1016/S0092-8674(00)80693-5
- Geijtenbeek, T.B.H., Vliet, S.J. van, Koppel, E.A., Sanchez-Hernandez, M., Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E., Appelmek, B., Kooyk, Y. van, 2003. Mycobacteria Target DC-SIGN to Suppress Dendritic Cell Function. *J. Exp. Med.* 197, 7–17. doi:10.1084/jem.20021229
- Geisler, C., Jarvis, D.L., 2011. Letter to the Glyco-Forum: Effective glycoanalysis with Maackia amurensis lectins requires a clear understanding of their binding specificities. *Glycobiology* 21, 988. doi:10.1093/glycob/cwr080

- Geissmann, F., Manz, M.G., Jung, S., Sieweke, M.H., Merad, M., Ley, K., 2010. Development of Monocytes, Macrophages, and Dendritic Cells. *Science* 327, 656–661. doi:10.1126/science.1178331
- Gilleron, M., Quesniaux, V.F.J., Puzo, G., 2003. Acylation State of the Phosphatidylinositol Hexamannosides from Mycobacterium bovis Bacillus Calmette Guérin and Mycobacterium tuberculosis H37Rv and Its Implication in Toll-like Receptor Response. *J. Biol. Chem.* 278, 29880–29889. doi:10.1074/jbc.M303446200
- Glavey, S.V., Manier, S., Natoni, A., Sacco, A., Moschetta, M., Reagan, M.R., Murillo, L.S., Sahin, I., Wu, P., Mishima, Y., Zhang, Yu, Zhang, W., Zhang, Yong, Morgan, G., Joshi, L., Roccaro, A.M., Ghobrial, I.M., O'Dwyer, M.E., 2014. The sialyltransferase ST3GAL6 influences homing and survival in multiple myeloma. *Blood* 124, 1765–1776. doi:10.1182/blood-2014-03-560862
- Gordon, S., 2003. Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 23–35. doi:10.1038/nri978
- Gordon, S., Martinez-Pomares, L., 2017. Physiological roles of macrophages. *Pflüg. Arch. - Eur. J. Physiol.* 469, 365–374. doi:10.1007/s00424-017-1945-7
- Gotsch, U., Jäger, U., Dominis, M., Vestweber, D., 1994. Expression of P-selectin on endothelial cells is upregulated by LPS and TNF-alpha in vivo. *Cell Adhes. Commun.* 2, 7–14.
- Goude, R., Amin, A.G., Chatterjee, D., Parish, T., 2009. The arabinosyltransferase EmbC is inhibited by ethambutol in Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 4138–4146. doi:10.1128/AAC.00162-09
- Gracheva, E.V., Samoilova, N.N., Golovanova, N.K., Andreeva, E.R., Andrianova, I.V., Tararak, E.M., Prokazova, N.V., 2007. Activation of ganglioside GM3 biosynthesis in human monocyte/macrophages during culturing in vitro. *Biochem. Biokhimiia* 72, 772–777.
- Gracheva, E.V., Samoilova, N.N., Golovanova, N.K., Kashirina, S.V., Shevelev, A., Rybalkin, I., Gurskaya, T., Vlasik, T.N., Andreeva, E.R., Prokazova, N.V., 2009. Enhancing of GM3 synthase expression during differentiation of human blood monocytes into macrophages as in vitro model of GM3 accumulation in atherosclerotic lesion. *Mol. Cell. Biochem.* 330, 121–129. doi:10.1007/s11010-009-0125-2
- Gringhuis, S.I., den Dunnen, J., Litjens, M., van het Hof, B., van Kooyk, Y., Geijtenbeek, T.B.H., 2007. C-Type Lectin DC-SIGN Modulates Toll-like Receptor Signaling via Raf-1 Kinase-Dependent Acetylation of Transcription Factor NF-κB. *Immunity* 26, 605–616. doi:10.1016/j.immuni.2007.03.012
- Groux-Degroote, S., Krzewinski-Recchi, M.-A., Cazet, A., Vincent, A., Lehoux, S., Lafitte, J.-J., Van Seuningen, I., Delannoy, P., 2008a. IL-6 and IL-8 increase the expression of glycosyltransferases and sulfotransferases involved in the biosynthesis of sialylated and/or sulfated Lewisx epitopes in the human bronchial mucosa. *Biochem. J.* 410, 213–223. doi:10.1042/BJ20070958

Groux-Degroote, S., Krzewinski-Recchi, M.-A., Cazet, A., Vincent, A., Lehoux, S., Lafitte, J.-J., van Seuningen, I., Delannoy, P., 2008b. IL-6 and IL-8 increase the expression of glycosyltransferases and sulfotransferases involved in the biosynthesis of sialylated and/or sulfated Lewis x epitopes in the human bronchial mucosa. *Biochem. J.* 410, 213–223. doi:10.1042/BJ20070958

Grunwell, J.R., Bertozzi, C.R., 2002. Carbohydrate Sulfotransferases of the GalNAc/Gal/GlcNAc6ST Family. *Biochemistry (Mosc.)* 41, 13117–13126. doi:10.1021/bi020507h

Guicciardi, M.E., Gores, G.J., 2009. Life and death by death receptors. *FASEB J.* 23, 1625–1637. doi:10.1096/fj.08-111005

Gundra, U.M., Girgis, N.M., Ruckerl, D., Jenkins, S., Ward, L.N., Kurtz, Z.D., Wiens, K.E., Tang, M.S., Basu-Roy, U., Mansukhani, A., Allen, J.E., Loke, P., 2014. Alternatively activated macrophages derived from monocytes and tissue macrophages are phenotypically and functionally distinct. *Blood* 123, e110–e122. doi:10.1182/blood-2013-08-520619

Guo, Y., Feinberg, H., Conroy, E., Mitchell, D.A., Alvarez, R., Blixt, O., Taylor, M.E., Weis, W.I., Drickamer, K., 2004. Structural basis for distinct ligand-binding and targeting properties of the receptors DC-SIGN and DC-SIGNR. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 591–598. doi:10.1038/nsmb784

H

Habuchi, O., Suzuki, Y., Fukuta, M., 1997. Sulfation of sialyl lactosamine oligosaccharides by chondroitin 6-sulfotransferase. *Glycobiology* 7, 405–412.

Hagen, T., G, K., Fritz, T.A., Tabak, L.A., 2003. All in the family: the UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases. *Glycobiology* 13, 1R–16R. doi:10.1093/glycob/cwg007

Han, L., Zhang, D., Tao, T., Sun, X., Liu, X., Zhu, G., Xu, Z., Zhu, L., Zhang, Y., Liu, W., Ke, K., Shen, A., 2015. The role of N-Glycan modification of TNFR1 in inflammatory microglia activation. *Glycoconj. J.* 32, 685–693. doi:10.1007/s10719-015-9619-1

Hanada, K., Kumagai, K., Yasuda, S., Miura, Y., Kawano, M., Fukasawa, M., Nishijima, M., 2003. Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide. *Nature* 426, 803–809. doi:10.1038/nature02188

Hang, Q., Isaji, T., Hou, S., Wang, Y., Fukuda, T., Gu, J., 2017. A Key Regulator of Cell Adhesion: Identification and Characterization of Important N-Glycosylation Sites on Integrin $\alpha 5$ for Cell Migration. *Mol. Cell. Biol.* 37. doi:10.1128/MCB.00558-16

Harduin-Lepers, A., Vallejo-Ruiz, V., Krzewinski-Recchi, M.-A., Samyn-Petit, B., Julien, S., Delannoy, P., 2001. The human sialyltransferase family. *Biochimie* 83, 727–737. doi:10.1016/S0300-9084(01)01301-3

Hare, N.J., Lee, L.Y., Loke, I., Britton, W.J., Saunders, B.M., Thaysen-Andersen, M., 2017. Mycobacterium tuberculosis Infection Manipulates the Glycosylation Machinery and the N-Glycoproteome of Human Macrophages and Their Microparticles. *J. Proteome Res.* 16, 247–263. doi:10.1021/acs.jproteome.6b00685

- Harrington, L.E., Hatton, R.D., Mangan, P.R., Turner, H., Murphy, T.L., Murphy, K.M., Weaver, C.T., 2005. Interleukin 17–producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat. Immunol.* 6, 1123–1132. doi:10.1038/ni1254
- Harris, E.B., Li, Y.T., Li, S.C., 1986. Ganglioside patterns in normal and lepromatous armadillo tissues. *Int. J. Lepr. Mycobact. Dis. Off. Organ Int. Lepr. Assoc.* 54, 289–293.
- Hayashi, F., Smith, K.D., Ozinsky, A., Hawn, T.R., Yi, E.C., Goodlett, D.R., Eng, J.K., Akira, S., Underhill, D.M., Aderem, A., 2001. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410, 1099–1103. doi:10.1038/35074106
- Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H., Bauer, S., 2004. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 303, 1526–1529. doi:10.1126/science.1093620
- Helenius, J., Ng, D.T.W., Marolda, C.L., Walter, P., Valvano, M.A., Aebi, M., 2002. Translocation of lipid-linked oligosaccharides across the ER membrane requires Rft1 protein. *Nature* 415, 447–450. doi:10.1038/415447a
- Hemmerich, S., Rosen, S.D., 1994. 6'-Sulfated Sialyl Lewis x Is a Major Capping Group of GlyCAM-1. *Biochemistry (Mosc.)* 33, 4830–4835. doi:10.1021/bi00182a011
- Hennet, T., Chui, D., Paulson, J.C., Marth, J.D., 1998. Immune regulation by the ST6Gal sialyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 4504–4509.
- Ho, W.-L., Hsu, W.-M., Huang, M.-C., Kadomatsu, K., Nakagawara, A., 2016. Protein glycosylation in cancers and its potential therapeutic applications in neuroblastoma. *J. Hematol. Oncol.* 9, 100. doi:10.1186/s13045-016-0334-6
- Holla, S., Ghorpade, D.S., Singh, V., Bansal, K., Balaji, K.N., 2014. Mycobacterium bovis BCG promotes tumor cell survival from tumor necrosis factor- α -induced apoptosis. *Mol. Cancer* 13, 210. doi:10.1186/1476-4598-13-210
- Hollingsworth, M.A., Swanson, B.J., 2004. Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. *Nat. Rev. Cancer* 4, 45–60. doi:10.1038/nrc1251
- Home : Functional Glycomics Gateway [WWW Document], n.d. URL <http://www.functionalglycomics.org/fg/> (accessed 11.16.15).
- Homeister, J.W., Thall, A.D., Petryniak, B., Malý, P., Rogers, C.E., Smith, P.L., Kelly, R.J., Gersten, K.M., Askari, S.W., Cheng, G., Smithson, G., Marks, R.M., Misra, A.K., Hindsgaul, O., Andrian, U.H. von, Lowe, J.B., 2001. The α (1,3)fucosyltransferases FucT-IV and FucT-VII Exert Collaborative Control over Selectin-Dependent Leukocyte Recruitment and Lymphocyte Homing. *Immunity* 15, 115–126. doi:10.1016/S1074-7613(01)00166-2
- Huang, H., Hao, S., Li, F., Ye, Z., Yang, J., Xiang, J., 2007. CD4+ Th1 cells promote CD8+ Tc1 cell survival, memory response, tumor localization and therapy by targeted delivery of interleukin 2 via acquired pMHC I complexes. *Immunology* 120, 148–159. doi:10.1111/j.1365-2567.2006.02452.x

Huang, M.-C., Zöllner, O., Moll, T., Maly, P., Thall, A.D., Lowe, J.B., Vestweber, D., 2000. P-selectin Glycoprotein Ligand-1 and E-selectin Ligand-1 Are Differentially Modified by Fucosyltransferases Fuc-TIV and Fuc-TVII in Mouse Neutrophils. *J. Biol. Chem.* 275, 31353–31360. doi:10.1074/jbc.M005449200

Isaji, T., Gu, J., Nishiuchi, R., Zhao, Y., Takahashi, M., Miyoshi, E., Honke, K., Sekiguchi, K., Taniguchi, N., 2004. Introduction of Bisecting GlcNAc into Integrin $\alpha 5\beta 1$ Reduces Ligand Binding and Down-regulates Cell Adhesion and Cell Migration. *J. Biol. Chem.* 279, 19747–19754. doi:10.1074/jbc.M311627200

Isaji, T., Sato, Y., Fukuda, T., Gu, J., 2009. N-Glycosylation of the I-like Domain of $\beta 1$ Integrin Is Essential for $\beta 1$ Integrin Expression and Biological Function IDENTIFICATION OF THE MINIMAL N-GLYCOSYLATION REQUIREMENT FOR $\alpha 5\beta 1$. *J. Biol. Chem.* 284, 12207–12216. doi:10.1074/jbc.M807920200

Isaji, T., Sato, Y., Zhao, Y., Miyoshi, E., Wada, Y., Taniguchi, N., Gu, J., 2006. N-Glycosylation of the β -Propeller Domain of the Integrin $\alpha 5$ Subunit Is Essential for $\alpha 5\beta 1$ Heterodimerization, Expression on the Cell Surface, and Its Biological Function. *J. Biol. Chem.* 281, 33258–33267. doi:10.1074/jbc.M607771200

Ishida, A., Akita, K., Mori, Y., Tanida, S., Toda, M., Inoue, M., Nakada, H., 2014. Negative regulation of Toll-like receptor-4 signaling through the binding of glycosylphosphatidylinositol-anchored glycoprotein, CD14, with the sialic acid-binding lectin, CD33. *J. Biol. Chem.* 289, 25341–25350. doi:10.1074/jbc.M113.523480

Ishijima, N., Suzuki, M., Ashida, H., Ichikawa, Y., Kanegae, Y., Saito, I., Borén, T., Haas, R., Sasakawa, C., Mimuro, H., 2011. BabA-mediated Adherence Is a Potentiator of the *Helicobacter pylori* Type IV Secretion System Activity. *J. Biol. Chem.* 286, 25256–25264. doi:10.1074/jbc.M111.233601

Ivetic, A., Ridley, A.J., 2004. The telling tail of L-selectin. *Biochem. Soc. Trans.* 32, 1118–1121. doi:10.1042/BST0321118

Iwabuchi, K., Nakayama, H., Oizumi, A., Suga, Y., Ogawa, H., Takamori, K., 2015a. Role of Ceramide from Glycosphingolipids and Its Metabolites in Immunological and Inflammatory Responses in Humans [WWW Document]. *Mediators Inflamm.* doi:10.1155/2015/120748

Iwabuchi, K., Nakayama, H., Oizumi, A., Suga, Y., Ogawa, H., Takamori, K., 2015b. Role of Ceramide from Glycosphingolipids and Its Metabolites in Immunological and Inflammatory Responses in Humans. *Mediators Inflamm.* 2015. doi:10.1155/2015/120748

Iwabuchi, K., Prinetti, A., Sonnino, S., Mauri, L., Kobayashi, T., Ishii, K., Kaga, N., Murayama, K., Kurihara, H., Nakayama, H., Yoshizaki, F., Takamori, K., Ogawa, H., Nagaoka, I., 2008. Involvement of very long fatty acid-containing lactosylceramide in lactosylceramide-mediated superoxide generation and migration in neutrophils. *Glycoconj. J.* 25, 357–374. doi:10.1007/s10719-007-9084-6

J

Jankute, M., Cox, J.A.G., Harrison, J., Besra, G.S., 2015. Assembly of the Mycobacterial Cell Wall. *Annu. Rev. Microbiol.* 69, 405–423. doi:10.1146/annurev-micro-091014-104121

Jenner, J., Kerst, G., Handgretinger, R., Müller, I., 2006. Increased α 2,6-sialylation of surface proteins on tolerogenic, immature dendritic cells and regulatory T cells. *Exp. Hematol.* 34, 1211–1217. doi:10.1016/j.exphem.2006.04.016

Jin, M.S., Kim, S.E., Heo, J.Y., Lee, M.E., Kim, H.M., Paik, S.-G., Lee, H., Lee, J.-O., 2007. Crystal Structure of the TLR1-TLR2 Heterodimer Induced by Binding of a Tri-Acylated Lipopeptide. *Cell* 130, 1071–1082. doi:10.1016/j.cell.2007.09.008

Jones, B.W., Means, T.K., Heldwein, K.A., Keen, M.A., Hill, P.J., Belisle, J.T., Fenton, M.J., 2001. Different Toll-like receptor agonists induce distinct macrophage responses. *J. Leukoc. Biol.* 69, 1036–1044.

Josefowicz, S.Z., Lu, L.-F., Rudensky, A.Y., 2012. Regulatory T Cells: Mechanisms of Differentiation and Function. *Annu. Rev. Immunol.* 30, 531–564. doi:10.1146/annurev.immunol.25.022106.141623

Ju, T., Wang, Y., Aryal, R.P., Lehoux, S.D., Ding, X., Kudelka, M.R., Cutler, C., Zeng, J., Wang, J., Sun, X., Heimburg-Molinaro, J., Smith, D.F., Cummings, R.D., 2013. Tn and sialyl-Tn antigens, aberrant O-glycomics as human disease markers. *PROTEOMICS – Clin. Appl.* 7, 618–631. doi:10.1002/prca.201300024

Julien, S., Grimshaw, M.J., Sutton-Smith, M., Coleman, J., Morris, H.R., Dell, A., Taylor-Papadimitriou, J., Burchell, J.M., 2007. Sialyl-Lewis^x on P-selectin glycoprotein ligand-1 is regulated during differentiation and maturation of dendritic cells: A mechanism involving the glycosyltransferases C2GnT1 and ST3Gal I. *J. Immunol.* 179, 5701–5710.

Jung, S.-B., Yang, C.-S., Lee, J.-S., Shin, A.-R., Jung, S.-S., Son, J.W., Harding, C.V., Kim, H.-J., Park, J.-K., Paik, T.-H., Song, C.-H., Jo, E.-K., 2006. The Mycobacterial 38-Kilodalton Glycolipoprotein Antigen Activates the Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway and Release of Proinflammatory Cytokines through Toll-Like Receptors 2 and 4 in Human Monocytes. *Infect. Immun.* 74, 2686–2696. doi:10.1128/IAI.74.5.2686-2696.2006

K

Kang, J.Y., Nan, X., Jin, M.S., Youn, S.-J., Ryu, Y.H., Mah, S., Han, S.H., Lee, H., Paik, S.-G., Lee, J.-O., 2009. Recognition of Lipopeptide Patterns by Toll-like Receptor 2-Toll-like Receptor 6 Heterodimer. *Immunity* 31, 873–884. doi:10.1016/j.immuni.2009.09.018

Kang, P.B., Azad, A.K., Torrelles, J.B., Kaufman, T.M., Beharka, A., Tibesar, E., DesJardin, L.E., Schlesinger, L.S., 2005. The human macrophage mannose receptor directs Mycobacterium tuberculosis lipoarabinomannan-mediated phagosome biogenesis. *J. Exp. Med.* 202, 987–999. doi:10.1084/jem.20051239

- Kannagi, R., Levery, S.B., Hakomori, S., 1985. Lea-active heptaglycosylceramide, a hybrid of type 1 and type 2 chain, and the pattern of glycolipids with Lea, Leb, X (Lex), and Y (Ley) determinants in human blood cell membranes (ghosts). Evidence that type 2 chain can elongate repetitively but type 1 chain cannot. *J. Biol. Chem.* 260, 6410–6415.
- Kariya, Yoshinobu, Kariya, Yukiko, Gu, J., 2017. Roles of Integrin $\alpha 6\beta 4$ Glycosylation in Cancer. *Cancers* 9, 79. doi:10.3390/cancers9070079
- Kataoka, H., Yasuda, M., Iyori, M., Kiura, K., Narita, M., Nakata, T., Shibata, K., 2006. Roles of N-linked glycans in the recognition of microbial lipopeptides and lipoproteins by TLR2. *Cell. Microbiol.* 8, 1199–1209. doi:10.1111/j.1462-5822.2006.00702.x
- Kaur, D., Guerin, M.E., Škovierová, H., Brennan, P.J., Jackson, M., 2009. Biogenesis of the cell wall and other glycoconjugates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Adv. Appl. Microbiol.* 69, 23–78. doi:10.1016/S0065-2164(09)69002-X
- Kaur, D., Obregón-Henao, A., Pham, H., Chatterjee, D., Brennan, P.J., Jackson, M., 2008. Lipoarabinomannan of *Mycobacterium*: mannose capping by a multifunctional terminal mannosyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 17973–17977. doi:10.1073/pnas.0807761105
- Kawasaki, T., Kawai, T., 2014. Toll-Like Receptor Signaling Pathways. *Front. Immunol.* 5. doi:10.3389/fimmu.2014.00461
- Kawashima, H., 2006. Roles of Sulfated Glycans in Lymphocyte Homing. *Biol. Pharm. Bull.* 29, 2343–2349. doi:10.1248/bpb.29.2343
- Kelly, R.J., Rouquier, S., Giorgi, D., Lennon, G.G., Lowe, J.B., 1995. Sequence and expression of a candidate for the human Secretor blood group alpha(1,2)fucosyltransferase gene (FUT2). Homozygosity for an enzyme-inactivating nonsense mutation commonly correlates with the non-secretor phenotype. *J. Biol. Chem.* 270, 4640–4649.
- Kerrigan, A.M., Brown, G.D., 2009. C-type lectins and phagocytosis. *Immunobiology, Vesicular trafficking in immune cells* 214, 562–575. doi:10.1016/j.imbio.2008.11.003
- Kim, Y.K., Shin, J.-S., Nahm, M.H., 2016. NOD-Like Receptors in Infection, Immunity, and Diseases. *Yonsei Med. J.* 57, 5–14. doi:10.3349/ymj.2016.57.1.5
- Kizuka, Y., Taniguchi, N., 2016. Enzymes for N-Glycan Branching and Their Genetic and Nongenetic Regulation in Cancer. *Biomolecules* 6, 25. doi:10.3390/biom6020025
- Klein, M.B., Hayes, S.F., Goodman, J.L., 1998. Monocytic differentiation inhibits infection and granulocytic differentiation potentiates infection by the agent of human granulocytic ehrlichiosis. *Infect. Immun.* 66, 3410–3415.
- Kohro, T., Tanaka, T., Murakami, T., Wada, Y., Aburatani, H., Hamakubo, T., Kodama, T., 2004. A comparison of differences in the gene expression profiles of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiated THP-1 cells and human monocyte-derived macrophage. *J. Atheroscler. Thromb.* 11, 88–97.
- Kovacic, N., Müthing, J., Marusic, A., 2000. Immunohistological and Flow Cytometric Analysis of Glycosphingolipid Expression in Mouse Lymphoid Tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 48, 1677–1689. doi:10.1177/002215540004801211

Kovacs-Simon, A., Titball, R.W., Michell, S.L., 2011. Lipoproteins of Bacterial Pathogens. *Infect. Immun.* 79, 548–561. doi:10.1128/IAI.00682-10

Kuball, J., Hauptrock, B., Malina, V., Antunes, E., Voss, R.-H., Wolfl, M., Strong, R., Theobald, M., Greenberg, P.D., 2009. Increasing functional avidity of TCR-redirected T cells by removing defined N-glycosylation sites in the TCR constant domain. *J. Exp. Med.* 206, 463–475. doi:10.1084/jem.20082487

Kumar, D., Nath, L., Kamal, M.A., Varshney, A., Jain, A., Singh, S., Rao, K.V.S., 2010. Genome-wide Analysis of the Host Intracellular Network that Regulates Survival of *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell* 140, 731–743. doi:10.1016/j.cell.2010.02.012

Kumar, D., Rao, K.V.S., 2011a. Regulation between survival, persistence, and elimination of intracellular mycobacteria: a nested equilibrium of delicate balances. *Microbes Infect.* 13, 121–133. doi:10.1016/j.micinf.2010.10.009

Kumar, D., Rao, K.V.S., 2011b. Regulation between survival, persistence, and elimination of intracellular mycobacteria: a nested equilibrium of delicate balances. *Microbes Infect.* 13, 121–133. doi:10.1016/j.micinf.2010.10.009

Kumar, S., Naqvi, R.A., Bhat, A.A., Rani, R., Ali, R., Agnihotri, A., Khanna, N., Rao, D.N., 2013. IL-10 production from dendritic cells is associated with DC SIGN in human leprosy. *Immunobiology* 218, 1488–1496. doi:10.1016/j.imbio.2013.05.004

L

Labie, D., 2003. Le génome des mycobactéries: étude biologique et interprétation évolutive. *MS M233decine Sci.* 19, 275–277. doi:10.7202/006460ar

Lahiri, S., Futerman, A.H., 2005. LASS5 Is a Bona Fide Dihydroceramide Synthase That Selectively Utilizes Palmitoyl-CoA as Acyl Donor. *J. Biol. Chem.* 280, 33735–33738. doi:10.1074/jbc.M506485200

Lai, W.K., Sun, P.J., Zhang, J., Jennings, A., Lalor, P.F., Hubscher, S., McKeating, J.A., Adams, D.H., 2006. Expression of DC-SIGN and DC-SIGNR on human sinusoidal endothelium: a role for capturing hepatitis C virus particles. *Am. J. Pathol.* 169, 200–208. doi:10.2353/ajpath.2006.051191

Lalvani, A., Sridhar, S., 2010. BCG vaccination: 90 years on and still so much to learn *Thorax* 65, 1036–1038. doi:10.1136/thx.2010.140996

Lambert, C., Landau, A.M., Desbarats, J., 2003. Fas—Beyond Death: A regenerative role for Fas in the nervous system. *Apoptosis* 8, 551–562. doi:10.1023/A:1026113222478

Larangé, A., Antonios, D., Pallardy, M., Kerdine-Römer, S., 2009. TLR7 and TLR8 agonists trigger different signaling pathways for human dendritic cell maturation. *J. Leukoc. Biol.* 85, 673–683. doi:10.1189/jlb.0808504

Laroui, H., Yan, Y., Narui, Y., Ingersoll, S.A., Ayyadurai, S., Charania, M.A., Zhou, F., Wang, B., Salaita, K., Sitaraman, S.V., Merlin, D., 2011. l-Ala- γ -d-Glu-meso-diaminopimelic Acid (DAP) Interacts Directly with Leucine-rich Region Domain of Nucleotide-binding Oligomerization Domain 1, Increasing Phosphorylation Activity of Receptor-interacting Serine/Threonine-protein Kinase 2 and Its Interaction with Nucleotide-binding Oligomerization Domain 1. *J. Biol. Chem.* 286, 31003–31013. doi:10.1074/jbc.M111.257501

Larsen, M.H., Biermann, K., Jacobs, W.R., 2007. Laboratory maintenance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr. Protoc. Microbiol.* Chapter 10, Unit 10A.1. doi:10.1002/9780471729259.mc10a01s6

Larsen, R.D., Ernst, L.K., Nair, R.P., Lowe, J.B., 1990. Molecular cloning, sequence, and expression of a human GDP-L-fucose:beta-D-galactoside 2-alpha-L-fucosyltransferase cDNA that can form the H blood group antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 6674–6678.

Le Cabec, V., Emorine, L.J., Toesca, I., Cougoule, C., Maridonneau-Parini, I., 2005. The human macrophage mannose receptor is not a professional phagocytic receptor. *J. Leukoc. Biol.* 77, 934–943. doi:10.1189/jlb.1204705

Le Pendu, J., Marionneau, S., Cailleau-Thomas, A., Rocher, J., Le Moullac-Vaidye, B., Clément, M., 2001. ABH and Lewis histo-blood group antigens in cancer. *APMIS* 109, 9–26. doi:10.1111/j.1600-0463.2001.tb00011.x

Lehrman, M.A., 1991. Biosynthesis of N-acetylglucosamine-P-P-dolichol, the committed step of asparagine-linked oligosaccharide assembly. *Glycobiology* 1, 553–562.

Leteux, C., Chai, W., Loveless, R.W., Yuen, C.-T., Uhlin-Hansen, L., Combarous, Y., Jankovic, M., Maric, S.C., Misulovin, Z., Nussenzweig, M.C., Ten Feizi, 2000. The Cysteine-Rich Domain of the Macrophage Mannose Receptor Is a Multispecific Lectin That Recognizes Chondroitin Sulfates a and B and Sulfated Oligosaccharides of Blood Group Lewis^a and Lewis^x Types in Addition to the Sulfated N-Glycans of Lutropin. *J. Exp. Med.* 191, 1117–1126.

Ley, K., 2003. The role of selectins in inflammation and disease. *Trends Mol. Med.* 9, 263–268. doi:10.1016/S1471-4914(03)00071-6

Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M.I., Nourshargh, S., 2007. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 678–689. doi:10.1038/nri2156

Li, J., Hsu, H.-C., Ding, Y., Li, H., Wu, Q., Yang, P., Luo, B., Rowse, A.L., Spalding, D.M., Bridges, S.L., Mountz, J.D., 2014. Inhibition of fucosylation reshapes inflammatory macrophages and suppresses type II collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheumatol.* Hoboken NJ 66, 2368–2379. doi:10.1002/art.38711

Liang, F., Seyrantepe, V., Landry, K., Ahmad, R., Ahmad, A., Stamatou, N.M., Pshezhetsky, A.V., 2006. Monocyte Differentiation Up-regulates the Expression of the Lysosomal Sialidase, Neu1, and Triggers Its Targeting to the Plasma Membrane via Major Histocompatibility Complex Class II-positive Compartments. *J. Biol. Chem.* 281, 27526–27538. doi:10.1074/jbc.M605633200

Linden, S.K., Sutton, P., Karlsson, N.G., Korolik, V., McGuckin, M.A., 2008. Mucins in the mucosal barrier to infection. *Mucosal Immunol.* 1, 183–197. doi:10.1038/mi.2008.5

Lissner, D., Schumann, M., Batra, A., Kredel, L.-I., Kühl, A.A., Erben, U., May, C., Schulzke, J.-D., Siegmund, B., 2015. Monocyte and M1 Macrophage-induced Barrier Defect Contributes to Chronic Intestinal Inflammation in IBD. *Inflamm. Bowel Dis.* 21, 1297–1305. doi:10.1097/MIB.0000000000000384

Litvack, M.L., Palaniyar, N., 2010. Review: Soluble innate immune pattern-recognition proteins for clearing dying cells and cellular components: implications on exacerbating or resolving inflammation. *Innate Immun.* 16, 191–200. doi:10.1177/1753425910369271

Liu, A.H., Liu, F., Li, Z., Gu, J.X., Chen, H.L., 1998. Alterations in glycosyltransferases during myeloid and monocytoid differentiation of HL-60 cells. *Cell Biol. Int.* 22, 545–550.

Liu, L., Liu, J., Niu, G., Xu, Q., Chen, Q., 2015. Mycobacterium tuberculosis 19-kDa lipoprotein induces Toll-like receptor 2-dependent peroxisome proliferator-activated receptor γ expression and promotes inflammatory responses in human macrophages. *Mol. Med. Rep.* 11, 2921–2926. doi:10.3892/mmr.2014.3070

Liu, T.-W., Ho, C.-W., Huang, H.-H., Chang, S.-M., Papat, S.D., Wang, Y.-T., Wu, M.-S., Chen, Y.-J., Lin, C.-H., 2009. Role for α -L-fucosidase in the control of Helicobacter pylori-infected gastric cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 14581–14586. doi:10.1073/pnas.0903286106

Liu, Z., Swindall, A.F., Kesterson, R.A., Schoeb, T.R., Bullard, D.C., Bellis, S.L., 2011. ST6Gal-I regulates macrophage apoptosis via α 2-6 sialylation of the TNFR1 death receptor. *J. Biol. Chem.* 286, 39654–39662. doi:10.1074/jbc.M111.276063

Loo, Y.-M., Gale, M., 2011. Immune signaling by RIG-I-like receptors. *Immunity* 34, 680–692. doi:10.1016/j.immuni.2011.05.003

Lorenzon, P., Vecile, E., Nardon, E., Ferrero, E., Harlan, J.M., Tedesco, F., Dobrina, A., 1998. Endothelial Cell E- and P-Selectin and Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Function as Signaling Receptors. *J. Cell Biol.* 142, 1381–1391.

Lowe, J.B., Stoolman, L.M., Nair, R.P., Larsen, R.D., Berhend, T.L., Marks, R.M., 1990. ELAM-1-dependent cell adhesion to vascular endothelium determined by a transfected human fucosyltransferase cDNA. *Cell* 63, 475–484.

Lu, J., Takahashi, T., Ohoka, A., Nakajima, K., Hashimoto, R., Miura, N., Tachikawa, H., Gao, X.-D., 2012. Alg14 organizes the formation of a multiglycosyltransferase complex involved in initiation of lipid-linked oligosaccharide biosynthesis. *Glycobiology* 22, 504–516. doi:10.1093/glycob/cwr162

M

Macauley, M.S., Crocker, P.R., Paulson, J.C., 2014. Siglec-mediated regulation of immune cell function in disease. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 653–666. doi:10.1038/nri3737

Maeda, N., Nigou, J., Herrmann, J.-L., Jackson, M., Amara, A., Lagrange, P.H., Puzo, G., Gicquel, B., Neyrolles, O., 2003. The Cell Surface Receptor DC-SIGN Discriminates between Mycobacterium Species through Selective Recognition of the Mannose Caps on Lipoarabinomannan. *J. Biol. Chem.* 278, 5513–5516. doi:10.1074/jbc.C200586200

- Magalhães, A., Marcos-Pinto, R., Nairn, A.V., Rosa, M. dela, Ferreira, R.M., Junqueira-Neto, S., Freitas, D., Gomes, J., Oliveira, P., Santos, M.R., Marcos, N.T., Xiaogang, W., Figueiredo, C., Oliveira, C., Dinis-Ribeiro, M., Carneiro, F., Moremen, K.W., David, L., Reis, C.A., 2015. Helicobacter pylori chronic infection and mucosal inflammation switches the human gastric glycosylation pathways. *Biochim. Biophys. Acta* 1852, 1928–1939. doi:10.1016/j.bbadis.2015.07.001
- Magalhaes, J.G., Lee, J., Geddes, K., Rubino, S., Philpott, D.J., Girardin, S.E., 2011. Essential role of Rip2 in the modulation of innate and adaptive immunity triggered by Nod1 and Nod2 ligands. *Eur. J. Immunol.* 41, 1445–1455. doi:10.1002/eji.201040827
- Malik, Z.A., Thompson, C.R., Hashimi, S., Porter, B., Iyer, S.S., Kusner, D.J., 2003. Cutting Edge: Mycobacterium tuberculosis Blocks Ca²⁺ Signaling and Phagosome Maturation in Human Macrophages Via Specific Inhibition of Sphingosine Kinase. *J. Immunol.* 170, 2811–2815. doi:10.4049/jimmunol.170.6.2811
- Malý, P., Thall, A.D., Petryniak, B., Rogers, C.E., Smith, P.L., Marks, R.M., Kelly, R.J., Gersten, K.M., Cheng, G., Saunders, T.L., Camper, S.A., Camphausen, R.T., Sullivan, F.X., Isogai, Y., Hindsgaul, O., von Andrian, U.H., Lowe, J.B., 1996. The $\alpha(1,3)$ Fucosyltransferase Fuc-TVII Controls Leukocyte Trafficking through an Essential Role in L-, E-, and P-selectin Ligand Biosynthesis. *Cell* 86, 643–653. doi:10.1016/S0092-8674(00)80137-3
- Mantovani, A., Marchesi, F., Malesci, A., Laghi, L., Allavena, P., 2017. Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 14, 399–416. doi:10.1038/nrclinonc.2016.217
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., Locati, M., 2004. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 25, 677–686. doi:10.1016/j.it.2004.09.015
- Marcos, N.T., Magalhães, A., Ferreira, B., Oliveira, M.J., Carvalho, A.S., Mendes, N., Gilmartin, T., Head, S.R., Figueiredo, C., David, L., Santos-Silva, F., Reis, C.A., 2008. Helicobacter pylori induces β 3GnT5 in human gastric cell lines, modulating expression of the SabA ligand sialyl-Lewis x. *J. Clin. Invest.* 118, 2325–2336. doi:10.1172/JCI34324
- Maródi, L., Korchak, H.M., Johnston, R.B., 1991. Mechanisms of host defense against Candida species. I. Phagocytosis by monocytes and monocyte-derived macrophages. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 146, 2783–2789.
- Marshall, R.D., 1972. Glycoproteins. *Annu. Rev. Biochem.* 41, 673–702. doi:10.1146/annurev.bi.41.070172.003325
- Martinez, F.O., Gordon, S., 2014. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000prime Rep.* 6.
- Martinez, F.O., Gordon, S., Locati, M., Mantovani, A., 2006. Transcriptional Profiling of the Human Monocyte-to-Macrophage Differentiation and Polarization: New Molecules and Patterns of Gene Expression. *J. Immunol.* 177, 7303–7311. doi:10.4049/jimmunol.177.10.7303
- Martinez-Pomares, L., 2012. The mannose receptor. *J. Leukoc. Biol.* 92, 1177–1186. doi:10.1189/jlb.0512231

- Martinez-Pomares, L., Reid, D.M., Brown, G.D., Taylor, P.R., Stillion, R.J., Linehan, S.A., Zamze, S., Gordon, S., Wong, S.Y.C., 2003. Analysis of mannose receptor regulation by IL-4, IL-10, and proteolytic processing using novel monoclonal antibodies. *J. Leukoc. Biol.* 73, 604–613. doi:10.1189/jlb.0902450
- Matarrese, P., Tinari, A., Mormone, E., Bianco, G.A., Toscano, M.A., Ascione, B., Rabinovich, G.A., Malorni, W., 2005. Galectin-1 Sensitizes Resting Human T Lymphocytes to Fas (CD95)-mediated Cell Death via Mitochondrial Hyperpolarization, Budding, and Fission. *J. Biol. Chem.* 280, 6969–6985. doi:10.1074/jbc.M409752200
- Means, T.K., Jones, B.W., Schromm, A.B., Shurtleff, B.A., Smith, J.A., Keane, J., Golenbock, D.T., Vogel, S.N., Fenton, M.J., 2001. Differential effects of a Toll-like receptor antagonist on Mycobacterium tuberculosis-induced macrophage responses. *J. Immunol.* 166, 4074–4082.
- Means, T.K., Wang, S., Lien, E., Yoshimura, A., Golenbock, D.T., Fenton, M.J., 1999. Human Toll-Like Receptors Mediate Cellular Activation by Mycobacterium tuberculosis. *J. Immunol.* 163, 3920–3927.
- Mendoza-Coronel, E., Castañón-Arreola, M., 2016. Comparative evaluation of in vitro human macrophage models for mycobacterial infection study. *Pathog. Dis.* 74, ftw052. doi:10.1093/femspd/ftw052
- Merad, M., Sathe, P., Helft, J., Miller, J., Mortha, A., 2013. The Dendritic Cell Lineage: Ontogeny and Function of Dendritic Cells and Their Subsets in the Steady State and the Inflamed Setting. *Annu. Rev. Immunol.* 31, 563–604. doi:10.1146/annurev-immunol-020711-074950
- Mihret, A., 2012. The role of dendritic cells in Mycobacterium tuberculosis infection. *Virulence* 3, 654–659. doi:10.4161/viru.22586
- Mishra, A., Akhtar, S., Jagannath, C., Khan, A., 2017. Pattern recognition receptors and coordinated cellular pathways involved in tuberculosis immunopathogenesis: Emerging concepts and perspectives. *Mol. Immunol.* 87, 240–248. doi:10.1016/j.molimm.2017.05.001
- Mitsuoka, C., Kawakami-Kimura, N., Kasugai-Sawada, M., Hiraiwa, N., Toda, K., Ishida, H., Kiso, M., Hasegawa, A., Kannagi, R., 1997. Sulfated sialyl Lewis X, the putative L-selectin ligand, detected on endothelial cells of high endothelial venules by a distinct set of anti-sialyl Lewis X antibodies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 230, 546–551. doi:10.1006/bbrc.1996.6012
- Mitsuoka, C., Sawada-Kasugai, M., Ando-Furui, K., Izawa, M., Nakanishi, H., Nakamura, S., Ishida, H., Kiso, M., Kannagi, R., 1998. Identification of a Major Carbohydrate Capping Group of the L-selectin Ligand on High Endothelial Venules in Human Lymph Nodes as 6-Sulfo Sialyl Lewis X. *J. Biol. Chem.* 273, 11225–11233. doi:10.1074/jbc.273.18.11225
- Mittar, D., Paramban, R., McIntyre, C., 2011. Flow Cytometry and High-Content Imaging to Identify Markers of Monocyte-Macrophage Differentiation.
- Mizutani, Y., Kihara, A., Igarashi, Y., 2005. Mammalian Lass6 and its related family members regulate synthesis of specific ceramides. *Biochem. J.* 390, 263–271. doi:10.1042/BJ20050291
- Mo, J., Boyle, J.P., Howard, C.B., Monie, T.P., Davis, B.K., Duncan, J.A., 2012. Pathogen Sensing by Nucleotide-binding Oligomerization Domain-containing Protein 2 (NOD2) Is Mediated by Direct Binding to Muramyl Dipeptide and ATP. *J. Biol. Chem.* 287, 23057–23067. doi:10.1074/jbc.M112.344283

- Mohorko, E., Glockshuber, R., Aebi, M., 2011. Oligosaccharyltransferase: the central enzyme of N-linked protein glycosylation. *J. Inherit. Metab. Dis.* 34, 869–878. doi:10.1007/s10545-011-9337-1
- Moliva, J.I., Turner, J., Torrelles, J.B., 2017. Immune Responses to Bacillus Calmette–Guérin Vaccination: Why Do They Fail to Protect against Mycobacterium tuberculosis? *Front. Immunol.* 8. doi:10.3389/fimmu.2017.00407
- Mollicone, R., Moore, S.E.H., Bovin, N., Garcia-Rosasco, M., Candelier, J.-J., Martinez-Duncker, I., Oriol, R., 2009. Activity, Splice Variants, Conserved Peptide Motifs, and Phylogeny of Two New α 1,3-Fucosyltransferase Families (FUT10 and FUT11). *J. Biol. Chem.* 284, 4723–4738. doi:10.1074/jbc.M809312200
- Momoi, T., Shinmoto, M., Kasuya, J., Senoo, H., Suzuki, Y., 1986. Activation of CMP-N-acetylneuraminic acid: lactosylceramide sialyltransferase during the differentiation of HL-60 cells induced by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *J. Biol. Chem.* 261, 16270–16273.
- Mondal, N., Buffone, A., Stolfa, G., Antonopoulos, A., Lau, J.T.Y., Haslam, S.M., Dell, A., Neelamegham, S., 2015. ST3Gal-4 is the primary sialyltransferase regulating the synthesis of E-, P-, and L-selectin ligands on human myeloid leukocytes. *Blood* 125, 687–696. doi:10.1182/blood-2014-07-588590
- Moremen, K.W., Tiemeyer, M., Nairn, A.V., 2012. Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 448–462. doi:10.1038/nrm3383
- Morgan, R., Gao, G., Pawling, J., Dennis, J.W., Demetriou, M., Li, B., 2004. N-Acetylglucosaminyltransferase V (Mgat5)-Mediated N-Glycosylation Negatively Regulates Th1 Cytokine Production by T Cells. *J. Immunol.* 173, 7200–7208. doi:10.4049/jimmunol.173.12.7200
- Moriwaki, K., Narisada, M., Imai, T., Shinzaki, S., Miyoshi, E., 2010. The effect of epigenetic regulation of fucosylation on TRAIL-induced apoptosis. *Glycoconj. J.* 27, 649–659. doi:10.1007/s10719-010-9310-5
- Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A., Coffman, R.L., 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 136, 2348–2357.
- Mosser, D.M., 2003. The many faces of macrophage activation. *J. Leukoc. Biol.* 73, 209–212. doi:10.1189/jlb.0602325
- Motta, V., Soares, F., Sun, T., Philpott, D.J., 2015. NOD-Like Receptors: Versatile Cytosolic Sentinels. *Physiol. Rev.* 95, 149–178. doi:10.1152/physrev.00009.2014
- Müller-Anstett, M.A., Müller, P., Albrecht, T., Nega, M., Wagener, J., Gao, Q., Kaesler, S., Schaller, M., Biedermann, T., Götz, F., 2010. Staphylococcal Peptidoglycan Co-Localizes with Nod2 and TLR2 and Activates Innate Immune Response via Both Receptors in Primary Murine Keratinocytes. *PLoS ONE* 5. doi:10.1371/journal.pone.0013153
-

N

Nairn, A.V., York, W.S., Harris, K., Hall, E.M., Pierce, J.M., Moremen, K.W., 2008. Regulation of Glycan Structures in Animal Tissues. *J. Biol. Chem.* 283, 17298–17313. doi:10.1074/jbc.M801964200

Nau, G.J., Richmond, J.F.L., Schlesinger, A., Jennings, E.G., Lander, E.S., Young, R.A., 2002. Human macrophage activation programs induced by bacterial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 1503–1508. doi:10.1073/pnas.022649799

Nigou, J., Zelle-Rieser, C., Gilleron, M., Thurnher, M., Puzo, G., 2001. Mannosylated Lipoarabinomannans Inhibit IL-12 Production by Human Dendritic Cells: Evidence for a Negative Signal Delivered Through the Mannose Receptor. *J. Immunol.* 166, 7477–7485. doi:10.4049/jimmunol.166.12.7477

Nojiri, H., Takaku, F., Terui, Y., Miura, Y., Saito, M., 1986. Ganglioside GM3: an acidic membrane component that increases during macrophage-like cell differentiation can induce monocytic differentiation of human myeloid and monocytoid leukemic cell lines HL-60 and U937. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83, 782–786.

Noss, E.H., Pai, R.K., Sellati, T.J., Radolf, J.D., Belisle, J., Golenbock, D.T., Boom, W.H., Harding, C.V., 2001. Toll-like receptor 2-dependent inhibition of macrophage class II MHC expression and antigen processing by 19-kDa lipoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 167, 910–918.

O

Ohmori, K., Kanda, K., Mitsuoka, C., Kanamori, A., Kurata-Miura, K., Sasaki, K., Nishi, T., Tamatani, T., Kannagi, R., 2000. P- and E-Selectins Recognize Sialyl 6-Sulfo Lewis X, the Recently Identified L-Selectin Ligand. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 278, 90–96. doi:10.1006/bbrc.2000.3768

Ohnishi, T., Muroi, M., Tanamoto, K., 2001. N-Linked Glycosylations at Asn26 and Asn114 of Human MD-2 Are Required for Toll-Like Receptor 4-Mediated Activation of NF- κ B by Lipopolysaccharide. *J. Immunol.* 167, 3354–3359. doi:10.4049/jimmunol.167.6.3354

Ohradanova-Repic, A., Machacek, C., Fischer, M.B., Stockinger, H., 2016. Differentiation of human monocytes and derived subsets of macrophages and dendritic cells by the HLDA10 monoclonal antibody panel. *Clin. Transl. Immunol.* 5, e55. doi:10.1038/cti.2015.39

O'Neill, L.A.J., Bowie, A.G., 2007. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 353–364. doi:10.1038/nri2079

Ordway, D., Harton, M., Henao-Tamayo, M., Montoya, R., Orme, I.M., Gonzalez-Juarrero, M., 2006. Enhanced Macrophage Activity in Granulomatous Lesions of Immune Mice Challenged with *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol.* 176, 4931–4939. doi:10.4049/jimmunol.176.8.4931

Ordway, D., Henao-Tamayo, M., Orme, I.M., Gonzalez-Juarrero, M., 2005. Foamy Macrophages within Lung Granulomas of Mice Infected with Mycobacterium tuberculosis Express Molecules Characteristic of Dendritic Cells and Antiapoptotic Markers of the TNF Receptor-Associated Factor Family. *J. Immunol.* 175, 3873–3881. doi:10.4049/jimmunol.175.6.3873

Oswald, I.P., Dozois, C.M., Petit, J.F., Lemaire, G., 1997. Interleukin-12 synthesis is a required step in trehalose dimycolate-induced activation of mouse peritoneal macrophages. *Infect. Immun.* 65, 1364–1369.

Otero-Estévez, O., Martínez-Fernández, M., Vázquez-Iglesias, L., Páez de la Cadena, M., Rodríguez-Berrocal, F., Martínez-Zorzano, V., 2013. Decreased Expression of Alpha-L-Fucosidase Gene FUCA1 in Human Colorectal Tumors. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 16986–16998. doi:10.3390/ijms140816986

P

Park, E.K., Jung, H.S., Yang, H.I., Yoo, M.C., Kim, C., Kim, K.S., 2007. Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli. *Inflamm. Res.* 56, 45–50. doi:10.1007/s00011-007-6115-5

Park, S.-S., Kim, W.-J., Moon, S.-K., 2011. Suppression of vascular smooth muscle cell responses induced by TNF- α in GM3 synthase gene transfected cells. *Int. J. Mol. Med.* 27, 147–154. doi:10.3892/ijmm.2010.561

Peter, M.E., Kubarenko, A.V., Weber, A.N.R., Dalpke, A.H., 2009. Identification of an N-Terminal Recognition Site in TLR9 That Contributes to CpG-DNA-Mediated Receptor Activation. *J. Immunol.* 182, 7690–7697. doi:10.4049/jimmunol.0900819

Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45.

Pinho, S.S., Reis, C.A., 2015. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. *Nat. Rev. Cancer* 15, 540–555. doi:10.1038/nrc3982

Plattner, V.E., Ratzinger, G., Engleder, E.T., Gallauner, S., Gabor, F., Wirth, M., 2009. Alteration of the glycosylation pattern of monocytic THP-1 cells upon differentiation and its impact on lectin-mediated drug delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 73, 324–330. doi:10.1016/j.ejpb.2009.07.004

Pocheć, E., Janik, M., Hoja-Łukowicz, D., Link-Lenczowski, P., Przybyło, M., Lityńska, A., 2013. Expression of integrins $\alpha 3\beta 1$ and $\alpha 5\beta 1$ and GlcNAc $\beta 1,6$ glycan branching influences metastatic melanoma cell migration on fibronectin. *Eur. J. Cell Biol.* 92, 355–362. doi:10.1016/j.ejcb.2013.10.007

Podbielska, M., Levery, S.B., Hogan, E.L., 2011. The structural and functional role of myelin fast-migrating cerebroside: pathological importance in multiple sclerosis. *Clin. Lipidol.* 6, 159–179. doi:10.2217/clp.11.8

Pralhada Rao, R., Vaidyanathan, N., Rengasamy, M., Mammen Oommen, A., Somaiya, N., Jagannath, M.R., 2013. Sphingolipid metabolic pathway: an overview of major roles played in human diseases. *J. Lipids* 2013, 178910. doi:10.1155/2013/178910

Prieto, J., Eklund, A., Patarroyo, M., 1994. Regulated expression of integrins and other adhesion molecules during differentiation of monocytes into macrophages. *Cell. Immunol.* 156, 191–211. doi:10.1006/cimm.1994.1164

Q

Quesniaux, V., Fremond, C., Jacobs, M., Parida, S., Nicolle, D., Yeremeev, V., Bihl, F., Erard, F., Botha, T., Drennan, M., Soler, M.-N., Le Bert, M., Schnyder, B., Ryffel, B., 2004. Toll-like receptor pathways in the immune responses to mycobacteria. *Microbes Infect.* 6, 946–959. doi:10.1016/j.micinf.2004.04.016

R

R Kornfeld, Kornfeld, and S., 1985. Assembly of Asparagine-Linked Oligosaccharides. *Annu. Rev. Biochem.* 54, 631–664. doi:10.1146/annurev.bi.54.070185.003215

Rabinovich, G.A., van Kooyk, Y., Cobb, B.A., 2012. Glycobiology of immune responses: Glycobiology of immune responses. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1253, 1–15. doi:10.1111/j.1749-6632.2012.06492.x

Raggi, F., Pelassa, S., Pierobon, D., Penco, F., Gattorno, M., Novelli, F., Eva, A., Varesio, L., Giovarelli, M., Bosco, M.C., 2017. Regulation of Human Macrophage M1–M2 Polarization Balance by Hypoxia and the Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1. *Front. Immunol.* 8. doi:10.3389/fimmu.2017.01097

Rajaram, M.V.S., Brooks, M.N., Morris, J.D., Torrelles, J.B., Azad, A.K., Schlesinger, L.S., 2010. Mycobacterium tuberculosis Activates Human Macrophage Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Linking Mannose Receptor Recognition to Regulation of Immune Responses. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 185, 929–942. doi:10.4049/jimmunol.1000866

Randolph, G.J., Angeli, V., Swartz, M.A., 2005. Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 617–628. doi:10.1038/nri1670

Reiding, K.R., Blank, D., Kuijper, D.M., Deelder, A.M., Wuhrer, M., 2014. High-throughput profiling of protein N-glycosylation by MALDI-TOF-MS employing linkage-specific sialic acid esterification. *Anal. Chem.* 86, 5784–5793. doi:10.1021/ac500335t

Reis e Sousa, C., 2006. Dendritic cells in a mature age. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 476–483. doi:10.1038/nri1845

Reynders, E., Foulquier, F., Annaert, W., Matthijs, G., 2011. How Golgi glycosylation meets and needs trafficking: the case of the COG complex. *Glycobiology* 21, 853–863. doi:10.1093/glycob/cwq179

Riendeau, C.J., Kornfeld, H., 2003. THP-1 Cell Apoptosis in Response to Mycobacterial Infection. *Infect. Immun.* 71, 254–259. doi:10.1128/IAI.71.1.254-259.2003

- Romero, C.D., Varma, T.K., Hobbs, J.B., Reyes, A., Driver, B., Sherwood, E.R., 2011. The Toll-Like Receptor 4 Agonist Monophosphoryl Lipid A Augments Innate Host Resistance to Systemic Bacterial Infection ▽. *Infect. Immun.* 79, 3576–3587. doi:10.1128/IAI.00022-11
- Rossez, Y., Gosset, P., Boneca, I.G., Magalhães, A., Ecobichon, C., Reis, C.A., Cieniewski-Bernard, C., Joncquel Chevalier Curt, M., Léonard, R., Maes, E., Sperandio, B., Slomianny, C., Sansonetti, P.J., Michalski, J.-C., Robbe-Masselot, C., 2014. The LacdiNAc-Specific Adhesin LabA Mediates Adhesion of *Helicobacter pylori* to Human Gastric Mucosa. *J. Infect. Dis.* 210, 1286–1295. doi:10.1093/infdis/jiu239
- Rószter, T., 2015. Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. *Mediators Inflamm.* 2015, 816460. doi:10.1155/2015/816460
- Rudd, P.M., Elliott, T., Cresswell, P., Wilson, I.A., Dwek, R.A., 2001. Glycosylation and the immune system. *Science* 291, 2370–2376.
- Ruggiano, A., Foresti, O., Carvalho, P., 2014. ER-associated degradation: Protein quality control and beyond. *J Cell Biol* 204, 869–879. doi:10.1083/jcb.201312042
- Rush, J.S., 2015. Role of Flippases in Protein Glycosylation in the Endoplasmic Reticulum. *Lipid Insights* 8, 45–53. doi:10.4137/LPI.S31784
- Russell, D.G., Barry, C.E., Flynn, J.L., 2010. Tuberculosis: What We Don't Know Can, and Does, Hurt Us. *Science* 328, 852–856. doi:10.1126/science.1184784
- Russell, D.G., Cardona, P.-J., Kim, M.-J., Allain, S., Altare, F., 2009. Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma. *Nat. Immunol.* 10, 943–948. doi:10.1038/ni.1781
- Ryan, S.O., Bonomo, J.A., Zhao, F., Cobb, B.A., 2011. MHCII glycosylation modulates *Bacteroides fragilis* carbohydrate antigen presentation. *J. Exp. Med.* 208, 1041–1053. doi:10.1084/jem.20100508
- Ryan, S.O., Cobb, B.A., 2012. Host glycans and antigen presentation. *Microbes Infect.* 14, 894–903. doi:10.1016/j.micinf.2012.04.010

S

- Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C., Lanzavecchia, A., 1995. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J. Exp. Med.* 182, 389–400. doi:10.1084/jem.182.2.389
- Sánchez, A., Espinosa, P., García, T., Mancilla, R., 2012. The 19 kDa *Mycobacterium tuberculosis* lipoprotein (LpqH) induces macrophage apoptosis through extrinsic and intrinsic pathways: a role for the mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Clin. Dev. Immunol.* 2012, 950503. doi:10.1155/2012/950503
- Santinha, D.R., Marques, D.R., Maciel, E.A., Simões, C.S.O., Rosa, S., Neves, B.M., Macedo, B., Domingues, P., Cruz, M.T., Domingues, M.R.M., 2012. Profiling changes triggered during maturation of dendritic cells: a lipidomic approach. *Anal. Bioanal. Chem.* 403, 457–471. doi:10.1007/s00216-012-5843-8

- Schachter, H., 1986. Biosynthetic controls that determine the branching and microheterogeneity of protein-bound oligosaccharides. *Biochem. Cell Biol. Biochim. Biol. Cell.* 64, 163–181.
- Schlesinger, L.S., Kaufman, T.M., Iyer, S., Hull, S.R., Marchiando, L.K., 1996. Differences in mannose receptor-mediated uptake of lipoarabinomannan from virulent and attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* by human macrophages. *J. Immunol. Baltim. Md* 157, 4568–4575.
- Schorey, J.S., Schlesinger, L.S., 2016. Innate Immune Responses to Tuberculosis. *Microbiol. Spectr.* 4. doi:10.1128/microbiolspec.TB2-0010-2016
- Schromm, A.B., Reiling, N., Howe, J., Wiesmuller, K.-H., Roessle, M., Brandenburg, K., 2010. Influence of serum on the immune recognition of a synthetic lipopeptide mimetic of the 19-kDa lipoprotein from *Mycobacterium tuberculosis*. *Innate Immun.* 16, 213–225. doi:10.1177/1753425909339232
- Schwarz, R.E., Wojciechowicz, D.C., Park, P.Y., Paty, P.B., 1996. Phytohemagglutinin-L (PHA-L) lectin surface binding of N-linked β 1–6 carbohydrate and its relationship to activated mutant ras in human pancreatic cancer cell lines. *Cancer Lett.* 107, 285–291. doi:10.1016/0304-3835(96)04386-8
- Schwende, H., Fitzke, E., Ambs, P., Dieter, P., 1996. Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1, 25-dihydroxyvitamin D₃. *J. Leukoc. Biol.* 59, 555–561.
- Scriba, T.J., Coussens, A.K., Fletcher, H.A., 2017. Human Immunology of Tuberculosis. *Microbiol. Spectr.* 5. doi:10.1128/microbiolspec.TB2-0016-2016
- Seales, E.C., Shaikh, F.M., Woodard-Grice, A.V., Aggarwal, P., McBrayer, A.C., Hennessy, K.M., Bellis, S.L., 2005. A Protein Kinase C/Ras/ERK Signaling Pathway Activates Myeloid Fibronectin Receptors by Altering α 1 Integrin Sialylation. *J. Biol. Chem.* 280, 37610–37615. doi:10.1074/jbc.M508476200
- Semel, A.C., 2002. Hyposialylation of Integrins Stimulates the Activity of Myeloid Fibronectin Receptors. *J. Biol. Chem.* 277, 32830–32836. doi:10.1074/jbc.M202493200
- Seyrantepe, V., Iannello, A., Liang, F., Kanshin, E., Jayanth, P., Samarani, S., Szewczuk, M.R., Ahmad, A., Pshezhetsky, A.V., 2010. Regulation of Phagocytosis in Macrophages by Neuraminidase 1. *J. Biol. Chem.* 285, 206–215. doi:10.1074/jbc.M109.055475
- Sharma, C.B., Knauer, R., Lehle, L., 2001. Biosynthesis of lipid-linked oligosaccharides in yeast: the ALG3 gene encodes the Dol-P-Man:Man5GlcNAc2-PP-Dol mannosyltransferase. *Biol. Chem.* 382, 321–328. doi:10.1515/BC.2001.039
- Shatnyeva, O.M., Kubarenko, A.V., Weber, C.E.M., Pappa, A., Schwartz-Albiez, R., Weber, A.N.R., Krammer, P.H., Lavrik, I.N., 2011. Modulation of the CD95-Induced Apoptosis: The Role of CD95 N-Glycosylation. *PLOS ONE* 6, e19927. doi:10.1371/journal.pone.0019927
- Shibuya, N., Goldstein, I.J., Broekaert, W.F., Nsimba-Lubaki, M., Peeters, B., Peumans, W.J., 1987. The elderberry (*Sambucus nigra* L.) bark lectin recognizes the Neu5Ac(α 2-6)Gal/GalNAc sequence. *J. Biol. Chem.* 262, 1596–1601.

- Shimada, K., Takimoto, H., Yano, I., Kumazawa, Y., 2006. Involvement of Mannose Receptor in Glycopeptidolipid-Mediated Inhibition of Phagosome-Lysosome Fusion. *Microbiol. Immunol.* 50, 243–251. doi:10.1111/j.1348-0421.2006.tb03782.x
- Shortman, K., Naik, S.H., 2007. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 19–30. doi:10.1038/nri1996
- Shukla, S., Richardson, E.T., Athman, J.J., Shi, L., Wearsch, P.A., McDonald, D., Banaei, N., Boom, W.H., Jackson, M., Harding, C.V., 2014. Mycobacterium tuberculosis Lipoprotein LprG Binds Lipoarabinomannan and Determines Its Cell Envelope Localization to Control Phagolysosomal Fusion. *PLOS Pathog.* 10, e1004471. doi:10.1371/journal.ppat.1004471
- Silva, Z., Tong, Z., Guadalupe Cabral, M., Martins, C., Castro, R., Reis, C., Trindade, H., Konstantopoulos, K., Videira, P.A., 2011. Sialyl Lewisx-dependent binding of human monocyte-derived dendritic cells to selectins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 409, 459–464. doi:10.1016/j.bbrc.2011.05.026
- Silver, R.F., Walrath, J., Lee, H., Jacobson, B.A., Horton, H., Bowman, M.R., Nocka, K., Sypek, J.P., 2009a. Human Alveolar Macrophage Gene Responses to *Mycobacterium tuberculosis* Strains H37Ra and H37Rv. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 40, 491–504. doi:10.1165/rcmb.2008-0219OC
- Silver, R.F., Walrath, J., Lee, H., Jacobson, B.A., Horton, H., Bowman, M.R., Nocka, K., Sypek, J.P., 2009b. Human Alveolar Macrophage Gene Responses to *Mycobacterium tuberculosis* Strains H37Ra and H37Rv. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 40, 491–504. doi:10.1165/rcmb.2008-0219OC
- Skacel, P.O., Edwards, A.J., Harrison, C.T., Watkins, W.M., 1991. Enzymic control of the expression of the X determinant (CD15) in human myeloid cells during maturation: the regulatory role of 6- sialyltransferase. *Blood* 78, 1452–1460.
- Skoog, E.C., Sjöling, Å., Navabi, N., Holgersson, J., Lundin, S.B., Lindén, S.K., 2012. Human Gastric Mucins Differently Regulate Helicobacter pylori Proliferation, Gene Expression and Interactions with Host Cells. *PLOS ONE* 7, e36378. doi:10.1371/journal.pone.0036378
- Smith, N.H., Hewinson, R.G., Kremer, K., Brosch, R., Gordon, S.V., 2009. Myths and misconceptions: the origin and evolution of Mycobacterium tuberculosis. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 537–544. doi:10.1038/nrmicro2165
- Soilleux, E.J., Morris, L.S., Leslie, G., Chehimi, J., Luo, Q., Levroney, E., Trowsdale, J., Montaner, L.J., Doms, R.W., Weissman, D., Coleman, N., Lee, B., 2002. Constitutive and induced expression of DC-SIGN on dendritic cell and macrophage subpopulations in situ and in vitro. *J. Leukoc. Biol.* 71, 445–457.
- Sperandio, M., 2012. The expanding role of α 2-3 sialylation for leukocyte trafficking in vivo. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1253, 201–205. doi:10.1111/j.1749-6632.2011.06271.x
- Sperandio, M., Gleissner, C.A., Ley, K., 2009. Glycosylation in immune cell trafficking. *Immunol. Rev.* 230, 97–113. doi:10.1111/j.1600-065X.2009.00795.x

Stamatos, N.M., Carubelli, I., Vlekkert, D. van de, Bonten, E.J., Papini, N., Feng, C., Venerando, B., d'Azzo, A., Cross, A.S., Wang, L.-X., Gomatos, P.J., 2010. LPS-induced cytokine production in human dendritic cells is regulated by sialidase activity. *J. Leukoc. Biol.* 88, 1227–1239. doi:10.1189/jlb.1209776

Stamatos, N.M., Liang, F., Nan, X., Landry, K., Cross, A.S., Wang, L.-X., Pshezhetsky, A.V., 2005. Differential expression of endogenous sialidases of human monocytes during cellular differentiation into macrophages: Sialidase expression in monocytes/macrophages. *FEBS J.* 272, 2545–2556. doi:10.1111/j.1742-4658.2005.04679.x

Stewart, G.R., Wilkinson, K.A., Newton, S.M., Sullivan, S.M., Neyrolles, O., Wain, J.R., Patel, J., Pool, K.-L., Young, D.B., Wilkinson, R.J., 2005. Effect of Deletion or Overexpression of the 19-Kilodalton Lipoprotein Rv3763 on the Innate Response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 73, 6831–6837. doi:10.1128/IAI.73.10.6831-6837.2005

Sturgill-Koszycki, S., Schlesinger, P.H., Chakraborty, P., Haddix, P.L., Collins, H.L., Fok, A.K., Allen, R.D., Gluck, S.L., Heuser, J., Russell, D.G., 1994. Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science* 263, 678–681. doi:10.1126/science.8303277

Su, Y., Bakker, T., Harris, J., Tsang, C., Brown, G.D., Wormald, M.R., Gordon, S., Dwek, R.A., Rudd, P.M., Martinez-Pomares, L., 2005. Glycosylation Influences the Lectin Activities of the Macrophage Mannose Receptor. *J. Biol. Chem.* 280, 32811–32820. doi:10.1074/jbc.M503457200

Sughii, S., Kabat, E.A., Baer, H.H., 1982. Further immunochemical studies on the combining sites of *Lotus tetragonolobus* and *Ulex europaeus* I and II lectins. *Carbohydr. Res.* 99, 99–101.

Svennerholm, L., 1980. Ganglioside designation. *Adv. Exp. Med. Biol.* 125, 11.

Swindall, A.F., Bellis, S.L., 2011. Sialylation of the Fas Death Receptor by ST6Gal-I Provides Protection against Fas-mediated Apoptosis in Colon Carcinoma Cells. *J. Biol. Chem.* 286, 22982–22990. doi:10.1074/jbc.M110.211375

T

Tailford, L.E., Crost, E.H., Kavanaugh, D., Juge, N., 2015. Mucin glycan foraging in the human gut microbiome. *Front. Genet.* 6. doi:10.3389/fgene.2015.00081

Tailleux, L., Pham-Thi, N., Bergeron-Lafaurie, A., Herrmann, J.-L., Charles, P., Schwartz, O., Scheinmann, P., Lagrange, P.H., Blic, J. de, Tazi, A., Gicquel, B., Neyrolles, O., 2005. DC-SIGN Induction in Alveolar Macrophages Defines Privileged Target Host Cells for *Mycobacteria* in Patients with Tuberculosis. *PLOS Med.* 2, e381. doi:10.1371/journal.pmed.0020381

Tailleux, L., Schwartz, O., Herrmann, J.-L., Pivert, E., Jackson, M., Amara, A., Legres, L., Dreher, D., Nicod, L.P., Gluckman, J.C., Lagrange, P.H., Gicquel, B., Neyrolles, O., 2003. DC-SIGN Is the Major *Mycobacterium tuberculosis* Receptor on Human Dendritic Cells. *J. Exp. Med.* 197, 121–127. doi:10.1084/jem.20021468

Takeuchi, O., Akira, S., 2010. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell* 140, 805–820. doi:10.1016/j.cell.2010.01.022

- Taki, T., Ishikawa, D., Ogura, M., Nakajima, M., Handa, S., 1997. Ganglioside GD1alpha functions in the adhesion of metastatic tumor cells to endothelial cells of the target tissue. *Cancer Res.* 57, 1882–1888.
- Tan, M.C.A.A., Mommaas, A.M., Drijfhout, J.W., Jordens, R., Onderwater, J.J.M., Verwoerd, D., Mulder, A.A., van der Heiden, A.N., Scheidegger, D., Oomen, L.C.J.M., Ottenhoff, T.H.M., Tulp, A., Neefjes, J.J., Koning, F., 1997. Mannose receptor-mediated uptake of antigens strongly enhances HLA class II-restricted antigen presentation by cultured dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 27, 2426–2435. doi:10.1002/eji.1830270942
- Tang, X.-L., Yuan, C.-H., Ding, Q., Zhou, Y., Pan, Q., Zhang, X.-L., 2017. Selection and identification of specific glycoproteins and glycan biomarkers of macrophages involved in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Tuberculosis* 104, 95–106. doi:10.1016/j.tube.2017.03.010
- Taniguchi, A., Higai, K., Hasegawa, Y., Utsumi, K., Matsumoto, K., 1998. Differentiation elicits negative regulation of human β -galactoside α 2,6-sialyltransferase at the mRNA level in the HL-60 cell line. *FEBS Lett.* 441, 191–194. doi:10.1016/S0014-5793(98)01548-8
- Taylor, P.R., Gordon, S., Martinez-Pomares, L., 2005. The mannose receptor: linking homeostasis and immunity through sugar recognition. *Trends Immunol.* 26, 104–110. doi:10.1016/j.it.2004.12.001
- Ternes, P., Franke, S., Zähringer, U., Sperling, P., Heinz, E., 2002. Identification and characterization of a sphingolipid delta 4-desaturase family. *J. Biol. Chem.* 277, 25512–25518. doi:10.1074/jbc.M202947200
- Thompson, M.R., Kaminski, J.J., Kurt-Jones, E.A., Fitzgerald, K.A., 2011. Pattern Recognition Receptors and the Innate Immune Response to Viral Infection. *Viruses* 3, 920–940. doi:10.3390/v3060920
- Tobisawa, Y., Imai, Y., Fukuda, M., Kawashima, H., 2010. Sulfation of Colonic Mucins by N-Acetylglucosamine 6-O-Sulfotransferase-2 and Its Protective Function in Experimental Colitis in Mice. *J. Biol. Chem.* 285, 6750–6760. doi:10.1074/jbc.M109.067082
- Torii, T., Fukuta, M., Habuchi, O., 2000. Sulfation of sialyl N-acetyllactosamine oligosaccharides and fetuin oligosaccharides by keratan sulfate Gal-6-sulfotransferase. *Glycobiology* 10, 203–211.
- Torrelles, J.B., Azad, A.K., Schlesinger, L.S., 2006. Fine Discrimination in the Recognition of Individual Species of Phosphatidyl-myo-Inositol Mannosides from *Mycobacterium tuberculosis* by C-Type Lectin Pattern Recognition Receptors. *J. Immunol.* 177, 1805–1816. doi:10.4049/jimmunol.177.3.1805
- Torrelles, J.B., Knaup, R., Kolareth, A., Slepishkina, T., Kaufman, T.M., Kang, P., Hill, P.J., Brennan, P.J., Chatterjee, D., Belisle, J.T., Musser, J.M., Schlesinger, L.S., 2008. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates with Altered Phagocytosis by Human Macrophages Due to a Truncated Lipoarabinomannan. *J. Biol. Chem.* 283, 31417–31428. doi:10.1074/jbc.M806350200

Torreno-Pina, J.A., Castro, B.M., Manzo, C., Buschow, S.I., Cambi, A., Garcia-Parajo, M.F., 2014. Enhanced receptor–clathrin interactions induced by N-glycan–mediated membrane micropatterning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 11037–11042. doi:10.1073/pnas.1402041111

Tortoli, E., 2006. The new mycobacteria: an update. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 48, 159–178. doi:10.1111/j.1574-695X.2006.00123.x

Tortoli, E., 2003. Impact of Genotypic Studies on Mycobacterial Taxonomy: the New Mycobacteria of the 1990s. *Clin. Microbiol. Rev.* 16, 319–354. doi:10.1128/CMR.16.2.319-354.2003

Trabelsi, N., Greffard, A., Pairon, J.-C., Bignon, J., Zanetti, G., Fubini, B., Pilatte, Y., 1997. Alterations in protein glycosylation in PMA-differentiated U-937 cells exposed to mineral particles. *Environ. Health Perspect.* 105, 1153.

Trottein, F., Schaffer, L., Ivanov, S., Paget, C., Vendeville, C., Cazet, A., Groux-Degroote, S., Lee, S., Krzewinski-Recchi, M.-A., Faveeuw, C., Head, S.R., Gosset, P., Delannoy, P., 2009. Glycosyltransferase and sulfotransferase gene expression profiles in human monocytes, dendritic cells and macrophages. *Glycoconj. J.* 26, 1259–1274. doi:10.1007/s10719-009-9244-y

Tsuchiya, S., Kobayashi, Y., Goto, Y., Okumura, H., Nakae, S., Konno, T., Tada, K., 1982. Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester. *Cancer Res.* 42, 1530–1536.

Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T., Tada, K., 1980. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int. J. Cancer* 26, 171–176.

Tsuji, S., Matsumoto, M., Takeuchi, O., Akira, S., Azuma, I., Hayashi, A., Toyoshima, K., Seya, T., 2000. Maturation of Human Dendritic Cells by Cell Wall Skeleton of Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guérin: Involvement of Toll-Like Receptors. *Infect. Immun.* 68, 6883–6890.

U

Udalova, I.A., Mantovani, A., Feldmann, M., 2016. Macrophage heterogeneity in the context of rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 12, 472–485. doi:10.1038/nrrheum.2016.91

V

Van Die, I., van Vliet, S.J., Nyame, A.K., Cummings, R.D., Bank, C.M.C., Appelmelk, B., Geijtenbeek, T.B.H., van Kooyk, Y., 2003. The dendritic cell-specific C-type lectin DC-SIGN is a receptor for Schistosoma mansoni egg antigens and recognizes the glycan antigen Lewis x. *Glycobiology* 13, 471–478. doi:10.1093/glycob/cwg052

Van Kooyk, Y., Rabinovich, G.A., 2008. Protein-glycan interactions in the control of innate and adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* 9, 593–601. doi:10.1038/ni.f.203

- Van Liempt, E., Bank, C.M.C., Mehta, P., Garcí'a-Vallejo, J.J., Kawar, Z.S., Geyer, R., Alvarez, R.A., Cummings, R.D., Kooyk, Y. van, van Die, I., 2006. Specificity of DC-SIGN for mannose- and fucose-containing glycans. *FEBS Lett.* 580, 6123–6131. doi:10.1016/j.febslet.2006.10.009
- Vandermeersch, S., Vanbeselaere, J., Delannoy, C.P., Drolez, A., Mysiorek, C., Guérardel, Y., Delannoy, P., Julien, S., 2015. Accumulation of GD1 α Ganglioside in MDA-MB-231 Breast Cancer Cells Expressing ST6GalNAc V. *Mol. Basel Switz.* 20, 6913–6924. doi:10.3390/molecules20046913
- Varki, A., 2016. Biological roles of glycans. *Glycobiology.* doi:10.1093/glycob/cww086
- Varki, A., 1994. Selectin ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 7390–7397.
- Vergne, I., Chua, J., Deretic, V., 2003. Tuberculosis Toxin Blocking Phagosome Maturation Inhibits a Novel Ca²⁺/Calmodulin-PI3K hVPS34 Cascade. *J. Exp. Med.* 198, 653–659. doi:10.1084/jem.20030527
- Vestweber, D., 1993. Glycoprotein ligands of the two endothelial selectins. *Res. Immunol.* 144, 704–708. doi:10.1016/S0923-2494(93)80055-4
- Videira, P.A., Amado, I.F., Crespo, H.J., Algueró, M.C., Dall'Olio, F., Cabral, M.G., Trindade, H., 2008. Surface alpha 2-3- and alpha 2-6-sialylation of human monocytes and derived dendritic cells and its influence on endocytosis. *Glycoconj. J.* 25, 259–268. doi:10.1007/s10719-007-9092-6
- Vignal, C., Guérardel, Y., Kremer, L., Masson, M., Legrand, D., Mazurier, J., Ellass, E., 2003. Lipomannans, but not lipoarabinomannans, purified from *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium kansasii* induce TNF-alpha and IL-8 secretion by a CD14-toll-like receptor 2-dependent mechanism. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 171, 2014–2023.
- Vignali, D.A.A., Collison, L.W., Workman, C.J., 2008. How regulatory T cells work. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 523–532. doi:10.1038/nri2343
- Villadangos, J.A., Young, L., 2008. Antigen-Presentation Properties of Plasmacytoid Dendritic Cells. *Immunity* 29, 352–361. doi:10.1016/j.immuni.2008.09.002
- Vogt, G., Chapgier, A., Yang, K., Chuzhanova, N., Feinberg, J., Fieschi, C., Boisson-Dupuis, S., Alcais, A., Filipe-Santos, O., Bustamante, J., de Beaucoudrey, L., Al-Mohsen, I., Al-Hajjar, S., Al-Ghonaïm, A., Adimi, P., Mirsaeidi, M., Khalilzadeh, S., Rosenzweig, S., de la Calle Martin, O., Bauer, T.R., Puck, J.M., Ochs, H.D., Furthner, D., Engelhorn, C., Belohradsky, B., Mansouri, D., Holland, S.M., Schreiber, R.D., Abel, L., Cooper, D.N., Soudais, C., Casanova, J.-L., 2005. Gains of glycosylation comprise an unexpectedly large group of pathogenic mutations. *Nat. Genet.* 37, 692–700. doi:10.1038/ng1581

W

- Waddell, S.J., Popper, S.J., Rubins, K.H., Griffiths, M.J., Brown, P.O., Levin, M., Relman, D.A., 2010. Dissecting Interferon-Induced Transcriptional Programs in Human Peripheral Blood Cells. *PLOS ONE* 5, e9753. doi:10.1371/journal.pone.0009753

- Wagner, K.W., Punnoose, E.A., Januario, T., Lawrence, D.A., Pitti, R.M., Lancaster, K., Lee, D., von Goetz, M., Yee, S.F., Totpal, K., Huw, L., Katta, V., Cavet, G., Hymowitz, S.G., Amler, L., Ashkenazi, A., 2007. Death-receptor O-glycosylation controls tumor-cell sensitivity to the proapoptotic ligand Apo2L/TRAIL. *Nat. Med.* 13, 1070–1077. doi:10.1038/nm1627
- Wang, D., Ozhegov, E., Wang, L., Zhou, A., Nie, H., Li, Y., Sun, X.-L., 2016. Sialylation and desialylation dynamics of monocytes upon differentiation and polarization to macrophages. *Glycoconj. J.* doi:10.1007/s10719-016-9664-4
- Wang, J.Q., Jeelall, Y.S., Ferguson, L.L., Horikawa, K., 2014. Toll-Like Receptors and Cancer: MYD88 Mutation and Inflammation. *Front. Immunol.* 5. doi:10.3389/fimmu.2014.00367
- Watanabe, M., Aoyagi, Y., Mitome, H., Fujita, T., Naoki, H., Ridell, M., Minnikin, D.E., 2002. Location of functional groups in mycobacterial meromycolate chains; the recognition of new structural principles in mycolic acids. *Microbiol. Read. Engl.* 148, 1881–1902. doi:10.1099/00221287-148-6-1881
- Watanabe, M., Aoyagi, Y., Ridell, M., Minnikin, D.E., 2001. Separation and characterization of individual mycolic acids in representative mycobacteria. *Microbiol. Read. Engl.* 147, 1825–1837. doi:10.1099/00221287-147-7-1825
- Weber, A.N.R., Morse, M.A., Gay, N.J., 2004. Four N-linked Glycosylation Sites in Human Toll-like Receptor 2 Cooperate to Direct Efficient Biosynthesis and Secretion. *J. Biol. Chem.* 279, 34589–34594. doi:10.1074/jbc.M403830200
- Wei, B.Y., Buerstedde, J.M., Bell, M., Chase, C., Nilson, A., Browne, A., Pease, L., McKean, D.J., 1991. Functional effects of N-linked oligosaccharides located on the external domain of murine class II molecules. *J. Immunol.* 146, 2358–2366.
- West, A.P., Brodsky, I.E., Rahner, C., Woo, D.K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Walsh, M.C., Choi, Y., Shadel, G.S., Ghosh, S., 2011. TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS. *Nature* 472, 476–480. doi:10.1038/nature09973
- Wheeler, S.F., Domann, P., Harvey, D.J., 2009. Derivatization of sialic acids for stabilization in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry and concomitant differentiation of alpha(2 --> 3)- and alpha(2 --> 6)-isomers. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* RCM 23, 303–312. doi:10.1002/rcm.3867
- Wiczyńska, Z., Miller-Podraza, H., Kościelak, J., 1980. The contribution of different glycoconjugates to the total ABH blood group activity of human erythrocytes. *FEBS Lett.* 112, 277–279. doi:10.1016/0014-5793(80)80197-9
- Wilkins, P.P., McEver, R.P., Cummings, R.D., 1996. Structures of the O-Glycans on P-selectin Glycoprotein Ligand-1 from HL-60 Cells. *J. Biol. Chem.* 271, 18732–18742. doi:10.1074/jbc.271.31.18732
- Wojtas, B., Fijalkowska, B., Włodarczyk, A., Schollenberger, A., Niemiałtowski, M., Hamasur, B., Pawłowski, A., Krzyżowska, M., 2011. Mannosylated lipoarabinomannan balances apoptosis and inflammatory state in mycobacteria-infected and uninfected bystander macrophages. *Microb. Pathog.* 51, 9–21. doi:10.1016/j.micpath.2011.03.004
- Wolfert, M.A., Boons, G.-J., 2013. Adaptive immune activation: glycosylation does matter. *Nat. Chem. Biol.* 9, 776–784. doi:10.1038/nchembio.1403

Woodard-Grice, A.V., McBrayer, A.C., Wakefield, J.K., Zhuo, Y., Bellis, S.L., 2008. Proteolytic Shedding of ST6Gal-I by BACE1 Regulates the Glycosylation and Function of $\alpha 4\beta 1$ Integrins. *J. Biol. Chem.* 283, 26364–26373. doi:10.1074/jbc.M800836200

World Health Organization, 2016. Global tuberculosis report 2016.

Wu, Y., Ren, D., Chen, G.-Y., 2016. Siglec-E Negatively Regulates the Activation of TLR4 by Controlling Its Endocytosis. *J. Immunol.* 1600772. doi:10.4049/jimmunol.1600772

Wucherpfennig, K.W., Gagnon, E., Call, M.J., Huseby, E.S., Call, M.E., 2010. Structural Biology of the T-cell Receptor: Insights into Receptor Assembly, Ligand Recognition, and Initiation of Signaling. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2. doi:10.1101/cshperspect.a005140

X

Xu, C., Ng, D.T.W., 2015. Glycosylation-directed quality control of protein folding. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16, nrm4073. doi:10.1038/nrm4073

Y

Yan, L., Wilkins, P.P., Alvarez-Manilla, G., Do, S.I., Smith, D.F., Cummings, R.D., 1997. Immobilized Lotus tetragonolobus agglutinin binds oligosaccharides containing the Le(x) determinant. *Glycoconj. J.* 14, 45–55.

Yang, H.-M., Yu, C., Yang, Z., 2012. N-acetylglucosaminyltransferase V negatively regulates integrin $\alpha 5\beta 1$ -mediated monocyte adhesion and transmigration through vascular endothelium. *Int. J. Oncol.* 41, 589–598. doi:10.3892/ijo.2012.1484

Yang, Z., Ming, X.-F., 2014. Functions of Arginase Isoforms in Macrophage Inflammatory Responses: Impact on Cardiovascular Diseases and Metabolic Disorders. *Front. Immunol.* 5. doi:10.3389/fimmu.2014.00533

Yohe, H.C., Wallace, P.K., Berenson, C.S., Ye, S., Reinhold, B.B., Reinhold, V.N., 2001. The major gangliosides of human peripheral blood monocytes/macrophages: absence of ganglio series structures. *Glycobiology* 11, 831–841.

Yohe, H.C., Ye, S., Reinhold, B.B., Reinhold, V.N., 1997. Structural characterization of the disialogangliosides of murine peritoneal macrophages. *Glycobiology* 7, 1215–1227.

Yoshida, T., Shiraishi, T., Horinaka, M., Wakada, M., Sakai, T., 2007. Glycosylation modulates TRAIL-R1/death receptor 4 protein: different regulations of two pro-apoptotic receptors for TRAIL by tunicamycin. *Oncol. Rep.* 18, 1239–1242.

Yoshida, Y., 2003. A Novel Role for N-Glycans in the ERAD System. *J. Biochem. (Tokyo)* 134, 183–190. doi:10.1093/jb/mvg128

Yoshida, Y.O., Umemura, M., Yahagi, A., O'Brien, R.L., Ikuta, K., Kishihara, K., Hara, H., Nakae, S., Iwakura, Y., Matsuzaki, G., 2010. Essential Role of IL-17A in the Formation of a Mycobacterial Infection-Induced Granuloma in the Lung. *J. Immunol.* 184, 4414–4422. doi:10.4049/jimmunol.0903332

Yoshimura, T., Hayashi, A., Handa-Narumi, M., Yagi, H., Ohno, N., Koike, T., Yamaguchi, Y., Uchimura, K., Kadomatsu, K., Sedzik, J., Kitamura, K., Kato, K., Trapp, B.D., Baba, H., Ikenaka, K., 2017. GlcNAc6ST-1 regulates sulfation of N-glycans and myelination in the peripheral nervous system. *Sci. Rep.* 7. doi:10.1038/srep42257

Z

Zamze, S., Martinez-Pomares, L., Jones, H., Taylor, P.R., Stillion, R.J., Gordon, S., Wong, S.Y.C., 2002. Recognition of bacterial capsular polysaccharides and lipopolysaccharides by the macrophage mannose receptor. *J. Biol. Chem.* 277, 41613–41623. doi:10.1074/jbc.M207057200

Zhang, X., Li, S., Luo, Y., Chen, Y., Cheng, S., Zhang, G., Hu, C., Chen, H., Guo, A., 2013. *Mycobacterium bovis* and BCG induce different patterns of cytokine and chemokine production in dendritic cells and differentiation patterns in CD4⁺ T cells. *Microbiology* 159, 366–379. doi:10.1099/mic.0.058198-0

Zhao, J.-H., Zhang, Y., Zhang, X.-Y., Chen, H.-L., 2003. Alteration in the expression of early stage processing enzymes of N-glycan during myeloid and monocytoid differentiation of HL-60 cells. *Leuk. Res.* 27, 599–605.

Zhao, Y., Sato, Y., Isaji, T., Fukuda, T., Matsumoto, A., Miyoshi, E., Gu, J., Taniguchi, N., 2008. Branched N-glycans regulate the biological functions of integrins and cadherins: Biological functions of branched N-glycans. *FEBS J.* 275, 1939–1948. doi:10.1111/j.1742-4658.2008.06346.x

Zheng, M., Fang, H., Tsuruoka, T., Tsuji, T., Sasaki, T., Hakomori, S., 1993. Regulatory role of GM3 ganglioside in alpha 5 beta 1 integrin receptor for fibronectin-mediated adhesion of FUA169 cells. *J. Biol. Chem.* 268, 2217–2222.

Zhu, J., Yamane, H., Paul, W.E., 2010. Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations. *Annu. Rev. Immunol.* 28, 445–489. doi:10.1146/annurev-immunol-030409-101212

Zhuo, Y., Bellis, S.L., 2011. Emerging Role of α 2,6-Sialic Acid as a Negative Regulator of Galectin Binding and Function. *J. Biol. Chem.* 286, 5935–5941. doi:10.1074/jbc.R110.191429

Zhuo, Y., Chammas, R., Bellis, S.L., 2008. Sialylation of β 1 Integrins Blocks Cell Adhesion to Galectin-3 and Protects Cells against Galectin-3-induced Apoptosis. *J. Biol. Chem.* 283, 22177–22185. doi:10.1074/jbc.M800015200

Annexe 1

Article

Accumulation of G_{D1α} ganglioside in MDA-MB-231 breast cancer cells expressing ST6GalNAc V

Sandy Vandermeersch¹, Jorick Vanbeselaere^{1,‡}, Clément P. Delannoy¹, Aurore Drolez², Caroline Mysiorek², Yann Guérardel¹, Philippe Delannoy^{1,*} and Sylvain Julien^{1,3}

¹ Structural and Functional Glycobiology Unit, UMR CNRS 8576, University of Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq, France.

E-Mails: sandy.vandermeersch@gmail.com (S.V.); jorick.vanbeselaere@gmail.com (J.V.); clément.delannoy@etudiant.univ-lille1.fr (C.P.D.); yann.guerardel@univ-lille1.fr (Y.G.); philippe.delannoy@univ-lille1.fr (P.D.); sylvain.julien@univ-lille1.fr (S.J.)

² Univ Lille Nord de France, Lille, France; UArtois, LBHE, EA-2465, F-62300, Lens, France; IMPRT-IFR114, Lille, France. E-Mails: aurore.drolez@univ-artois.fr (A.D.); cj.mysiorek@univ-artois.fr (C.M.)

³ Cell Plasticity and Cancer, INSERM U908, University of Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq, France.

[‡] Present address: Division of Biochemistry (DCH/BC), University of Natural Resources and Life Sciences, 1190 Vienna, Austria

* Author to whom correspondence should be addressed; e-mail: philippe.delannoy@univ-lille1.fr; Tel.: +33-320-436-923; Fax: +33-320-436-555.

External Editor:

Received: / Accepted: / Published:

Abstract: Alpha-series gangliosides define a particular sub-class of glycosphingolipids containing sialic acid α 2,6-linked to GalNAc residue that was isolated as a minor compound from the brain. The sialyltransferase ST6GalNAc V was cloned from mouse brain and showed α 2,6-sialyltransferase activity almost exclusively for G_{M1b}, to form G_{D1α} and is considered as the main enzyme involved in the biosynthesis of α -series gangliosides. Recently, *ST6GALNAC5* was identified as one of the genes over-expressed in breast cancer cell populations selected for their ability to produce brain metastasis. However, the capacity of Human breast cancer cells to produce α -series gangliosides has never been clearly demonstrated. Here, we show by stable transfection and MS-MS analysis of total glyco-

sphingolipids that *ST6GALNAC5* expressing MDA-MB-231 breast cancer cells accumulate $G_{D1\alpha}$ ganglioside ($IV^3Neu5Ac_1,III^6Neu5Ac_1Gg_4-Cer$).

Keywords: ST6GalNAc V; Breast cancer; MDA-MB-231; α -gangliosides; $G_{D1\alpha}$

Abbreviations: BSA: Bovine Serum Albumin; Cer: ceramide; DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium; FBS: Fetal Bovine Serum; GFP: green fluorescent protein; GSL: glycosphingolipid; HPRT: Hypoxanthine PhosphoRibosylTransferase; LacCer: Lactosylceramide; MALDI-TOF: matrix assisted laser desorption-ionization time-of-flight; MS: Mass Spectrometry; PBS: Phosphate Buffered Saline; PCR: Polymerase Chain Reaction; qPCR: Quantitative real-time PCR; SNA: *Sambucus nigra* agglutinin; WT: Wild Type.

1. Introduction

Gangliosides, the glycosphingolipids (GSL) carrying one or several sialic acid residues, are essentially located on the outer leaflet of the plasma membrane where they form lipid rafts with cholesterol and other sphingolipids. Gangliosides were demonstrated to be essential molecules in the modulation of signal transduction pathways by their interactions with signal transduction molecules including receptors tyrosine kinases. Gangliosides are therefore involved in cell adhesion, proliferation and recognition processes [1]. GSL from the ganglio-series are usually classified in four series (0-, a-, b- and c-series) according to the presence of 0 to 3 sialic acid residues linked to lactosylceramide [2]. Normal human tissues mainly express gangliosides from 0- and a-series whereas more 'complex' gangliosides from b- and c-series are mainly restricted to the nervous system [3]. The expression of complex gangliosides increases under several pathological conditions including neurodegenerative disorders [4], immune diseases [5] and cancers [6]. For example, G_{D3} and G_{D2} are over-expressed in neuroectoderm-derived tumors such as melanoma, neuroblastoma and triple-negative breast cancer, in which they mediate cell proliferation, migration, tumor growth and angiogenesis [6].

Alpha-series gangliosides define a particular sub-class of GSL containing Neu5Ac α 2,6-linked to the GalNAc residue of the gangliopentaosyl backbone $Neu5Ac\alpha 2-3Gal\beta 1-3GalNAc\beta 1-4Gal\beta 1-4Glc$ ($IV^3Neu5Ac_1G_{g4}$). The typical α -series ganglioside $G_{D1\alpha}$ ($IV^3Neu5Ac_1,III^6Neu5Ac_1Gg_4-Cer$) was first isolated as a minor compound from rat ascites hepatoma AH 7974F cells [7] and from bovine brain [8], with an expression restricted to particular cell populations of the forebrain, the midbrain and the cerebellum [9]. Three members of the CMP-Neu5Ac: β -N-acetylgalactosaminide α 2,6-sialyltransferase family (ST6GalNAc III, V and VI) were shown to catalyze *in vitro* the transfer of a sialic acid residue onto G_{M1b} ($IV^3Neu5Ac_1Gg_4-Cer$) to form $G_{D1\alpha}$ [10]. However, according to its substrate specificity and expression pattern, ST6GalNAc V is generally considered as the main $G_{D1\alpha}$ synthase. ST6GalNAc V cDNA was cloned from mouse brain [11, 12] and *st6galnac5* gene is specifically expressed in brain tissues, mostly in forebrain and cerebellum [12]. When expressed as a soluble re-

combinant protein, the mouse ST6GalNAc V showed α 2,6-sialyltransferase activity almost exclusively for G_{M1b} , while being inactive toward glycoproteins [11]. The recombinant mouse ST6GalNAc VI was also shown to convert *in vitro* G_{M1b} , G_{D1a} , and G_{T1b} into α -series gangliosides $G_{D1\alpha}$, $G_{T1a\alpha}$, and $G_{Q1b\alpha}$, respectively [13]. However, this enzyme was lately demonstrated to be responsible for the synthesis of disialyl-Le^a but not for α -series gangliosides in human colon tissues [14]. To our knowledge, the enzymatic activity of human ST6GalNAc V was never thoroughly investigated. However, it was shown that transfection of Human ST6GalNAc V into U373MG glioma cells produced the unusual α 2,6-monosialoganglioside, $G_{M2\alpha}$ (Neu5Ac α 2-6GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc-Cer, III⁶Neu5Ac₁G_{g3}-Cer) instead of $G_{D1\alpha}$ [15].

To date, little is known concerning the specific function of α -series gangliosides. It has been proposed that $G_{D1\alpha}$ could play a role in Purkinje cell functions in the cerebellum [9] and that $G_{D1\alpha}$ could serve as an adhesion molecule for high-metastatic murine lymphosarcoma cell line RAW117-H10 in the adhesion to hepatic sinusoidal endothelial cells [16]. *ST6GALNAC5* gene was also shown playing a role in HeLa cell adhesion [17, 18] and recently, *ST6GALNAC5* was identified as one of the genes over-expressed in breast cancer cell populations selected for their ability to produce brain metastasis [19]. ShRNA inhibition of *ST6GALNAC5* expression reduced the capacity of breast cancer cells to produce brain metastasis whereas the expression of *ST6GALNAC5* in parental cell lines promoted brain metastasis formation [19]. Moreover, *ST6GALNAC5* was demonstrated as the only gene specifically correlated with brain metastasis of breast cancer and up-regulated in human brain metastasis samples [20]. However, the capacity of Human breast cancer cells that express *ST6GALNAC5* to produce α -series gangliosides has never been clearly demonstrated. Here, we show by MS analysis of total GSL that *ST6GALNAC5* expressing MDA-MB-231 breast cancer cells accumulate $G_{D1\alpha}$ ganglioside.

2. Results and Discussion

2.1. Quantitative Real-Time-PCR (qPCR) analysis of ST6GalNAc V expression in transfected MDA-MB-231 cells

MDA-MB-231 cells were transfected with the pIRES2-AcGFP1 expression vector containing the full-length cDNA of human ST6GalNAc V or the empty vector as control. pIRES2-AcGFP1 is a bicistronic expression vector designed for the simultaneous expression of green fluorescent protein (GFP) and a protein of interest in mammalian cells. Transfected cells were cultured 14 days in the presence of 1 mg/mL G418. Eighteen individual G418-resistant colonies were isolated by limiting dilution and analyzed for the expression of ST6GalNAc V transcripts. No amplification was obtained for thirteen of the resistant clones (not shown) and of the 5 clones showing over-expression of ST6GalNAc V mRNA compared to control cells, the clone #13 displayed the highest level (317-fold) (Fig. 1). In parallel, the G418-resistant cell population was sorted for GFP expression and 5.5% of the cell population was selected (Fig. 2). The resulting GFP-positive cell population was analyzed for the expression of ST6GalNAc V and shown a high level of ST6GalNAc V mRNA expression compared to control cells (1657-fold) (Fig. 1).

Figure 1. QPCR analysis of ST6GalNAc V expression in control and transfected MDA-MB-231 cells. Quantification of ST6GalNAc V expression was performed by the method described by Pfaffl [21] and normalized to HPRT. The expression of ST6GalNAc V was relative to wild-type (wt), which was regarded as 1. Ctrl, control cells transfected with the empty vector; GFP+, GFP-positive cell population.

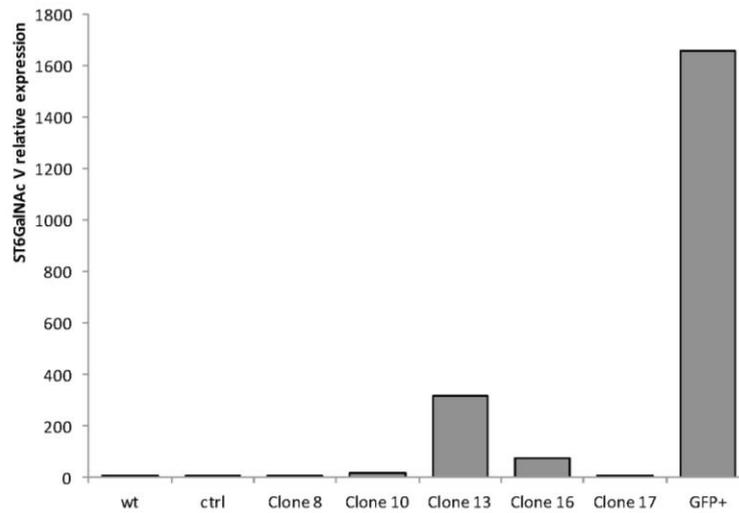
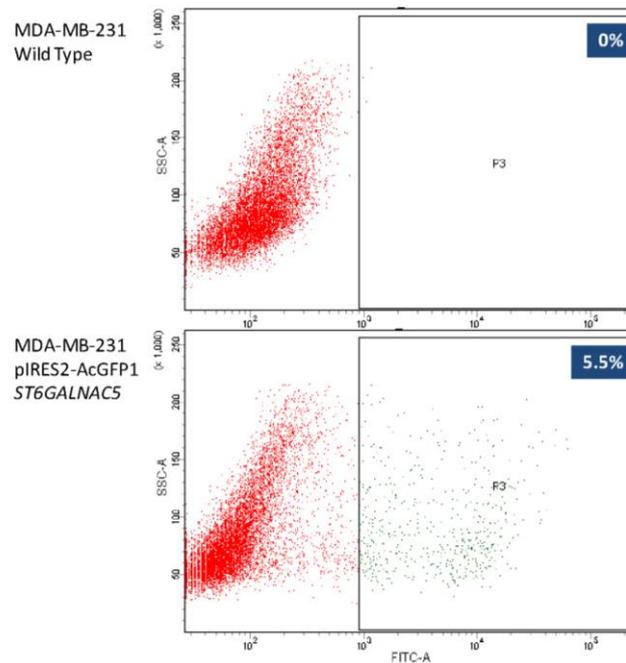


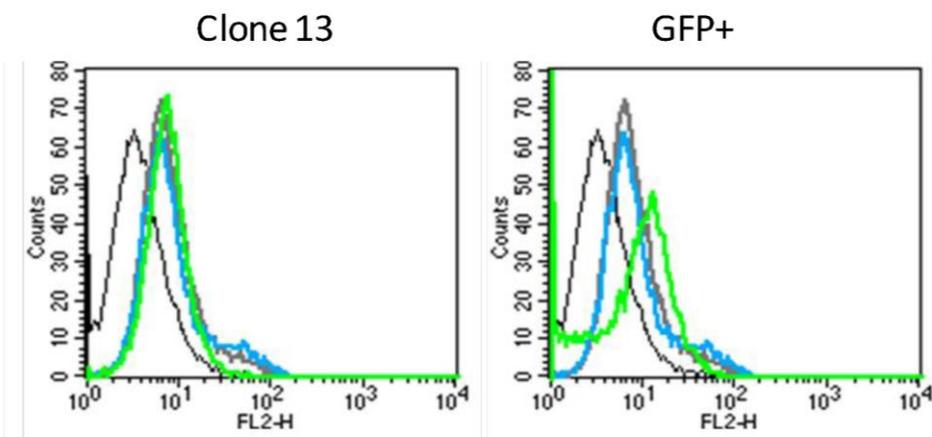
Figure 2. Cell sorting for GFP expression of the G418-resistant cell population. The G418-resistant cell population was sorted for GFP expression on an ARIA SORP flow cytometer.



2.2. Flow Cytometry Analysis of α 2,6-sialylation using *Sambucus nigra* agglutinin (SNA)

The α 2,6-sialylation of clone #13 and GFP-positive cell population was analyzed by flow cytometry using SNA lectin that binds to Neu5Ac α 2-Gal/GalNAc sequence [22]. No change in SNA binding was observed for clone #13 compared to control cells whereas a slight increase of SNA binding was observed for the GFP-positive cell population (Fig. 3). Control cells showed no change in SNA binding compared to wild-type MDA-MB-231 (data not shown).

Figure 3. Flow cytometry analysis of α 2,6-sialylation in ST6GalNAc V transfected MDA-MB-231 cells. Detection of α 2,6-sialylation was performed using Biotin-labeled SNA and revealed with PE-conjugated streptavidin. Black line, PE-streptavidin alone; grey line, MDA-MB-231 wild type; blue line, control cells transfected with the empty vector; green line, ST6GalNAc V transfected cells.

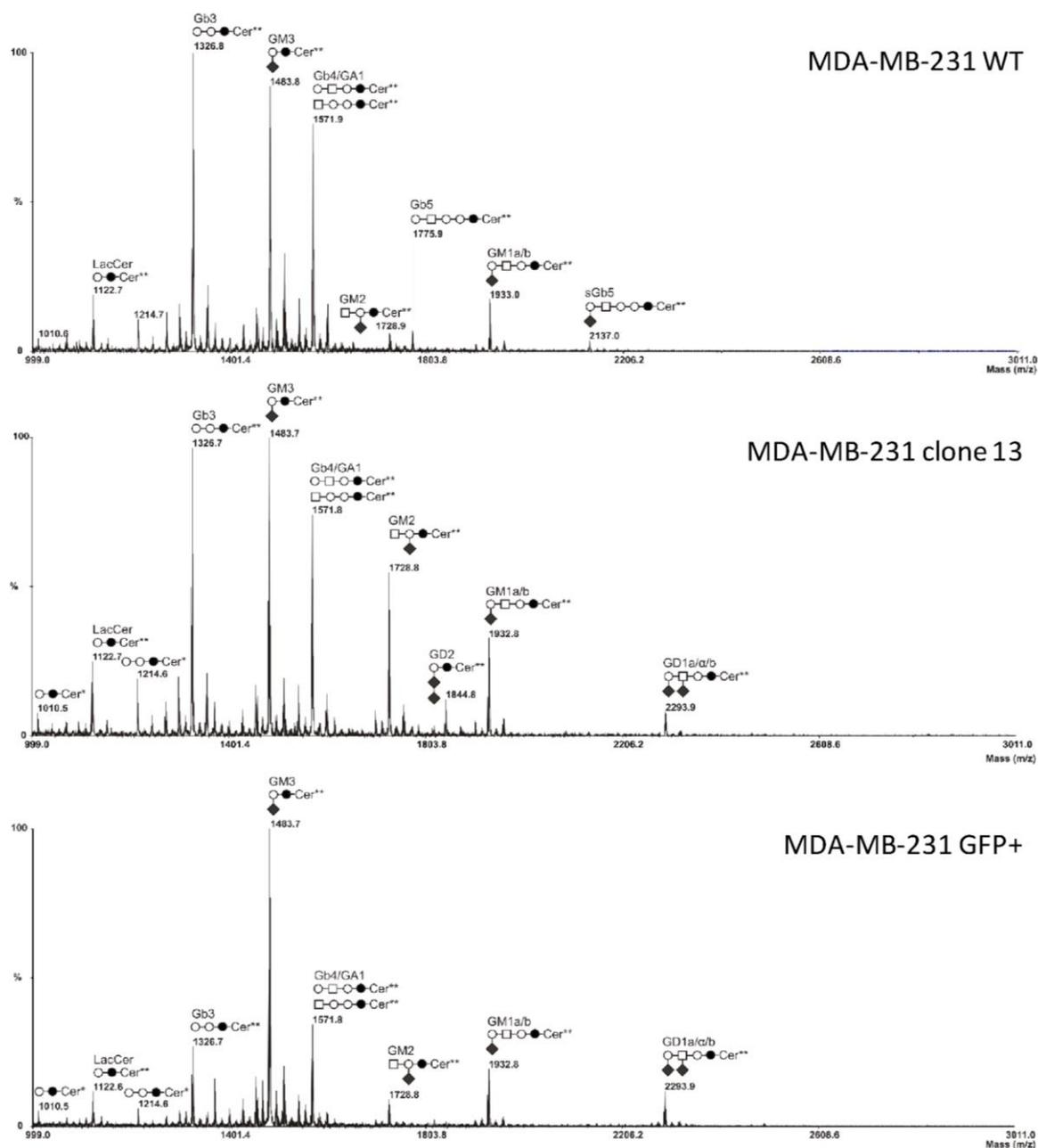


2.3. MS Analysis of GSL in ST6GalNAc V transfected MDA-MB-231 cells

Total glycosphingolipids were extracted from control and ST6GalNAc V expressing cells, purified by reverse phase chromatography and permethylated prior to MS analysis. As previously shown [23], wild type or empty vector-transfected MDA-MB-231 (not shown) cells expressed neutral globosides G_{b3} and G_{b4} and monosialylated gangliosides, mainly G_{M3} (Fig. 4A). The precursor lactosylceramide was also detected, as well as a monosialoganglioside at m/z 1933, which was confirmed to correspond to G_{M1b} by MALDI-TOF/TOF fragmentation analysis (data not shown). Two ceramide isoforms are commonly expressed in human tissues due to the substitution of the sphingosine moiety by palmitic acid C16:0 (Cer*) or lignoceric acid C24:0 (Cer**) (Fig. 4).

As shown in Figures 4B and 4C, the composition in GSL of clone #13 and GFP-positive cell population was very similar to control cells with the notable expression at an additional signal at m/z 2294.5 that was tentatively identified as an isomer of G_{D1} ganglioside (G_{D1a} , G_{D1b} , G_{D1c} or $G_{D1\alpha}$) with 3 hexoses, one N-acetylhexosamine and 2 N-acetylneuraminic acid residues.

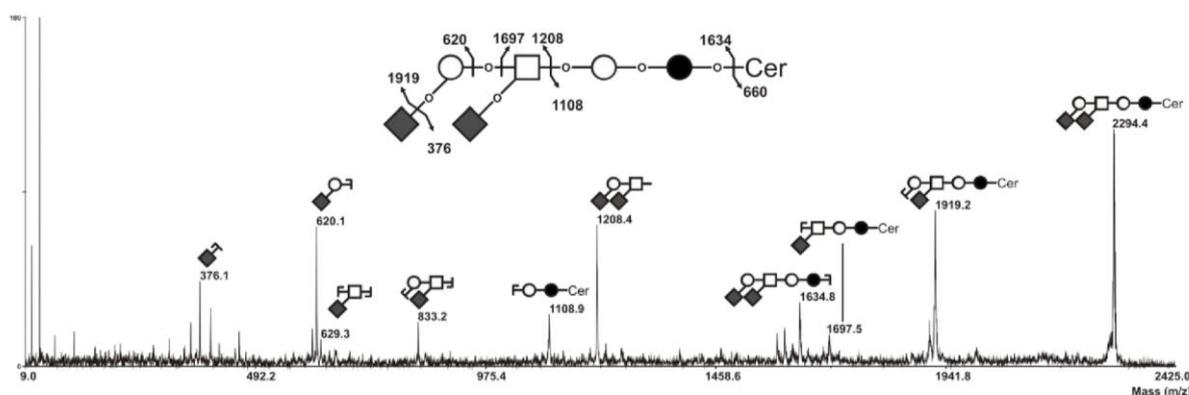
Figure 4. Comparison of MS profiles of permethylated glycosphingolipids purified from MDA-MB-231 wt, clone #13 and GFP+ ST6GalNAc V transfected cells. GSL are present as d18:1/C16:0 (Cer*) and d18:1/C24:0 (Cer**) isomers. ○, Gal; ●, Glc; □, GalNAc; ◆, Neu5Ac.



MALDI-TOF/TOF fragmentation analysis established that this signal corresponded to $G_{D1\alpha}$, as shown in Figure 5. Indeed, the $[M+Na]^+$ B/Y-ions at m/z 1208/1108 attested the presence of a terminal HexNAc₁Hex₁Neu5Ac₂ tetrasaccharide, excluding G_{D1a} and G_{D1b} isomers in which at least one N-acetylneuraminic acid residue is linked to the internal galactose residue and characterised by B/Y-ions

at m/z 847/1469 and m/z 486/1830, respectively [24]. Then, the presence of $[M+Na]^+$ secondary ion at m/z 629 testified the presence of an internal HexNAc₁Neu5Ac₁ disaccharide unit, characteristic from the α -series gangliosides. Finally, the absence of $[M+Na]^+$ B-ions at m/z 759, which corresponds to a disialylated sequence finally excluded G_{D1c} isomer. Altogether, these data clearly demonstrate that the additional signal at m/z 2295 that appeared in the GSL composition of clone #13 and GFP-positive cell population corresponded exclusively to G_{D1 α} .

Figure 5. MS/MS sequencing of permethylated G_{D1} at m/z 2295 with ceramide moieties d18:1/C24:0 (Cer**). All fragments are observed as $[M+Na]^+$ adducts. Fragment ions were annotated according to nomenclature of Domon and Costello [25]. The nature of monosaccharides was deduced from known biosynthesis of gangliosides. ○, Gal; ●, Glc; □, GalNAc; ◆, Neu5Ac.



3. Experimental Section

3.1. Cell Culture and transfection

The breast cancer cell line MDA-MB-231 was 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. The full-length human ST6GalNAc V cDNA [11] was amplified by PCR from the Mammalian Gene Collection (MGC) clone 3356535 using sense 5'-gtagctagctcgagatgaagaccctgatgcgcatgg-3' and antisense 5'-atatatagatctgaattctcagtgctcgggtctgagtc-3' primers containing *EcoRI* and *XhoI* restriction sites, respectively (underlined) and inserted into the *EcoRI* and *XhoI* sites of the bicistronic pIRES2-AcGFP1 expression vector designed for the simultaneous expression in mammalian cells of green fluorescent protein (GFP) and the protein of interest (Clontech, Mountain View, CA, USA). The resulting plasmid was purified using NucleoSpin purification kit (Macherey-Nagel, Hoerd, France) according to manufacturer's instructions and fully sequenced. Transfection was performed by lipofection using Lipofectamine® 2000 (Invitrogen). After transfection, cells were maintained for 48 h in DMEM at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂ and then

cultured in the presence of 1 mg/mL G418 (Invitrogen). After 14 days in the selective medium, individual G418-resistant colonies were isolated by limit dilution. Alternatively, the G418-resistant cell population was sorted for GFP expression on an ARIA SORP flow cytometer (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France). Control cells (empty vector transfected) and ST6GalNAc V positive cells were cultured in the presence of 1 mg/mL G418 (Invitrogen).

3.2. QPCR analysis of ST6GalNAc V

Total RNA was extracted using the Nucleospin RNA II kit (Macherey Nagel), quantified using DS-11 spectrophotometer (Denovix, Wilmington, DE, USA) and the purity of the preparation was checked by ratio of the absorbance at 260 and 280 nm. The cDNA was synthesized with 2 µg of RNA using the Maxima first strand cDNA Synthesis kit (Thermo Fisher Scientific, Langensfeld, Germany). PCR primers for Hypoxanthine PhosphoRibosylTransferase (HPRT) were previously described [26]. Primers for ST6GalNAc V (sense: 5'-ggatccaatcacccttcag-3', antisense: 5'-tagcaagtgtctgtttcca-3') were designed using Primer 3 software. QPCR reactions (25 µL) were performed using Maxima SYBR Green Fluorescein qPCR MasterMix (Thermo Fisher Scientific), with 2 µL of cDNA solution and 300 nM final concentration of each primer in a Mx3005p qPCR System (Stratagene, La Jolla, CA, USA). PCR conditions were: 95 °C for 30 s, 51 °C for 45 s, 72 °C for 30 s (40 cycles). Assays were performed in triplicate and ST6GalNAc V transcript expression level was normalized to HPRT using the method described by Pfaffl [21]. 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.

3.3. Flow Cytometry Analysis

Cells were washed in cold PBS and detached by: 5 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). Cells were incubated at 4 °C during 1 h with 10 µg/mL Biotin-labeled SNA (Vector Laboratories, Burlingame CA, USA) diluted in phosphate buffered saline (PBS) containing 1% bovine serum albumin (PBS-BSA) (Sigma-Aldrich). After washing with PBS-BSA, cells were incubated 30 min on ice with phycoerythrin (PE) conjugated streptavidin (Life Technologies) and analyzed by flow cytometry (FACScalibur, BD Biosciences).

3.4. Extraction and Preparation of Glycolipids

Twenty dishes (10 cm diameter) of cultured cells were washed twice with ice-cold PBS and cells were 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 [27]. Samples were reconstituted in CH₃OH/H₂O (1:1, v/v) and applied to a reverse phase C₁₈ cartridge (Waters, Milford, MA) equilibrated in the same solvent. After washing with CH₃OH/H₂O (1:1, v/v), GSL were eluted by CH₃OH, CHCl₃/CH₃OH (1:1, v/v) and CHCl₃/CH₃OH (2:1, v/v).

3.5. Mass Spectrometry Analysis of GSL

Prior to mass spectrometry analysis, GSL were permethylated according to Ciucanu and Kerek [28]. Briefly, compounds were incubated 2 h in a suspension of 200 mg/mL NaOH in dry DMSO (400 μ L) and CH₃I (200 μ L). 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 positive reflectron mode. For MS acquisition, 5 μ L of diluted permethylated samples in CHCl₃ were mixed with 5 μ L of 2,5-dihydroxybenzoic acid matrix solution (10 mg/mL dissolved in CHCl₃/CH₃OH (1:1, v/v)). The mixtures (2 μ L) were then spotted on the target plate and air dried. MS survey data comprises a total of 50 sub-spectra of 1,500 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.

4. Conclusion

The α -series gangliosides define a rare subclass of GSL essentially restricted to some area of mammalian brain. α -gangliosides biological function, however, remains mostly unknown. Based on the substrate specificity of soluble recombinant enzymes, the α 2,6-sialyltransferase ST6GalNAc V is considered as the main G_{D1 α} synthase. Strikingly, ST6GalNAc V expression is also restricted to the brain. The identification of *ST6GALNAC5* as one of the genes involved in breast cancer brain metastasis [19] raised the question of the capacity of breast cancer cells to synthesize α -series gangliosides. Here, we show for the first time that the expression of Human ST6GalNAc V cDNA in Human cancer cells (MDA-MB-231) results in the accumulation of G_{D1 α} . However, the question of the role of α -series gangliosides in breast cancer brain metastasis remains open. To our knowledge, no recognition protein was identified to date to specifically bind α -series gangliosides [29]. *ST6GALNAC5* gene was previously identified playing a role in controlling the degree of cell adhesion in HeLa cells. It was shown that higher *ST6GALNAC5* transcription correlated with a lower degree of adhesion, siRNA inhibition of *ST6GALNAC5* transcription being followed by enhanced adhesion [18]. Furthermore, the expression of *ST6GALNAC5*, presumably increasing the expression of α -series gangliosides in breast cancer cells could promote their capacity to form brain metastasis. Although the authors showed *ST6GALNAC5* over-expression increased transmigration through a brain-like endothelial barrier, the *in vitro* model using HUVEC endothelial cells may be questionable. Further investigation are required in order to delineate the molecular mechanism that allows the recognition of α -series gangliosides and the role of these glycolipids in the brain metastasis cascade.

Acknowledgments

This work was supported by the University of Sciences and Technologies of Lille, the CNRS and the comité du Pas-de-Calais de La Ligue contre le Cancer.

Author Contributions

SV, JV, CPD, AD performed the experiments; YG analyzed the data and participated to the redaction; CM participated to the redaction; PD and SJ conceived and designed the experiments, analyzed the data and wrote the manuscript.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References and Notes

1. Julien, S.; Bobowski, M.; Steenackers, A.; Le Bourhis, X.; Delannoy, P. How Do Gangliosides Regulate RTKs Signaling? *Cells* **2013**, *2*, 751-767.
2. Svennerholm, L. Ganglioside designation. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1980**, *125*, 11-19.
3. 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.
4. Ariga, T.; McDonald, M.P.; Yu, R.K. Role of ganglioside metabolism in the pathogenesis of Alzheimer's disease--a review. *J. Lipid Res.* **2008**, *49*, 1157-1175.
5. Shahrizaila, N.; Yuki, N. Guillain-Barré syndrome animal model: the first proof of molecular mimicry in human autoimmune disorder. *J. Biomed. Biotechnol.* **2011**, *2011*, 829129.
6. Bobowski, M.; Cazet, A.; Steenackers, A.; Delannoy, P. Role of Complex Gangliosides in Cancer Progression. *Carbohydr. Chem.* **2012**, *37*, 1-20.
7. Taki, T.; Hirabayashi, Y.; Ishikawa, H.; Ando, S.; Kon, K.; Tanaka, Y.; Matsumoto M. A ganglioside of rat ascites hepatoma AH 7974F cells. Occurrence of a novel disialoganglioside (GD1 alpha) with a unique N-acetylneuraminosyl (alpha 2-6)-N-acetylgalactosamine structure. *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 3075-3078.
8. Hirabayashi, Y.; Hyogo, A.; Nakao, T.; Tsuchiya, K.; Suzuki, Y.; Matsumoto, M.; Kon, K.; Ando, S. Isolation and characterization of extremely minor gangliosides; GM1b and GD1 alpha; in adult bovine brains as developmentally regulated antigens. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 8144-8151.
9. Furuya, S.; Irie, F.; Hashikawa, T.; Nakazawa, K.; Kozakai, A.; Hasegawa, A.; Sudo, K.; Hirabayashi, Y. Ganglioside GD1 alpha in cerebellar Purkinje cells. Its specific absence in mouse mutants with Purkinje cell abnormality and altered immunoreactivity in response to conjunctive stimuli causing long-term desensitization. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 32418-32425.
10. Harduin-Lepers A. Vertebrate Sialyltransferases. In: *Sialobiology: Structure; Biosynthesis and Function Sialic Acid Glycoconjugates in Health and Disease*. Martínez-Duncker, J.T., editor. Bentham Science Publishers; **2013**. p. 139-187.
11. Okajima, T.; Fukumoto, S.; Ito, H.; Kiso, M.; Hirabayashi, Y.; Urano, T.; Furukawa, K. Molecular cloning of brain-specific GD1alpha synthase (ST6GalNAc V) containing CAG/Glutamine repeats. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 30557-30562.

12. Ikehara, Y.; Shimizu, N.; Kono, M.; Nishihara, S.; Nakanishi, H.; Kitamura, T.; Narimatsu, H.; Tsuji, S.; Tatematsu, M. A novel glycosyltransferase with a polyglutamine repeat; a new candidate for GD1alpha synthase (ST6GalNAc V). *FEBS Lett.* **1999**, *463*, 92-96.
13. Okajima, T.; Chen, H.H.; Ito, H.; Kiso, M.; Tai, T.; Furukawa, K.; Urano, T.; Furukawa, K. Molecular cloning and expression of mouse GD1alpha/GT1alpha/GQ1balpha synthase (ST6GalNAc VI) gene. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 6717-6723.
14. Tsuchida, A.; Okajima, T.; Furukawa, K.; Ando, T.; Ishida, H.; Yoshida, A.; Nakamura Y.; Kannagi R.; Kiso M.; Furukawa K. Synthesis of disialyl Lewis a (Le(a)) structure in colon cancer cell lines by a sialyltransferase; ST6GalNAc VI; responsible for the synthesis of alpha-series gangliosides. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 22787-22794.
15. Kroes, R.A.; He, H.; Emmett, M.R.; Nilsson, C.L.; Leach, F.E. 3rd; Amster, I.J.; Marshall, A.G.; Moskal, J.R. Overexpression of ST6GalNAcV, a ganglioside-specific alpha2,6-sialyltransferase, inhibits glioma growth in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2010**, *107*, 12646-12651.
16. Taki, T.; Ishikawa, D.; Ogura, M.; Nakajima, M.; Handa, S. Ganglioside GD1alpha functions in the adhesion of metastatic tumor cells to endothelial cells of the target tissue. *Cancer Res.* **1997**, *57*, 1882-1888.
17. Chu, C.; Lugovtsev, V.; Golding, H.; Betenbaugh, M.; Shiloach, J. Conversion of MDCK cell line to suspension culture by transfecting with human sial7e gene and its application for influenza virus production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2009**, *106*, 14802-14807.
18. Jaluria, P.; Betenbaugh, M.; Konstantopoulos, K.; Frank, B.; Shiloach, J. Application of microarrays to identify and characterize genes involved in attachment dependence in HeLa cells. *Metab. Eng.* **2007**, *9*, 241-251.
19. Bos, P.D.; Zhang, X.H.; Nadal, C.; Shu, W.; Gomis, R.R.; Nguyen, D.X.; Minn, A.J.; van de Vijver, M.J.; Gerald, W.L.; Foekens, J.A.; Massagué, J. Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain. *Nature* **2009**, *459*, 1005-1009.
20. Lorusso, G.; Rüegg, C. New insights into the mechanisms of organ-specific breast cancer metastasis. *Semin. Cancer Biol.* **2012**, *22*, 226-233.
21. Pfaffl, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, e45.
22. Shibuya, N.; Goldstein, I.J.; Broekaert, W.F.; Nsimba-Lubaki, M.; Peeters, B.; Peumans, W.J. The elderberry (*Sambucus nigra* L.) bark lectin recognizes the Neu5Ac(alpha2-6)Gal/GalNAc sequence. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 1596-1601.
23. Cazet, A.; Bobowski, M.; Rombouts, Y.; Lefebvre, J.; Steenackers, A.; Popa, I.; Guérardel, Y.; Le Bourhis, X.; Tulasne, D.; Delannoy, P. The ganglioside G(D2) induces the constitutive activation of c-Met in MDA-MB-231 breast cancer cells expressing the G(D3) synthase. *Glycobiology* **2012**, *22*, 806-816.
24. 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. *Comptes Rendus Chimie* **2012**, *15*, 3-14.
25. Domon, B.; Costello, C.E. Structure elucidation of glycosphingolipids and gangliosides using high-performance tandem mass spectrometry. *Biochemistry* **1988**, *27*, 1534-1543.

26. 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.
27. Schnaar, R.L. Isolation of glycosphingolipids. *Methods Enzymol.* **1994**, *230*, 348-370.
28. Ciucanu, I.; Kerek, F. Rapid and simultaneous methylation of fatty and hydroxy fatty acids for gas-liquid chromatographic analysis. *J. Chromatogr. A.* **1984**, *284*, 179-185.
29. Krengel, U.; Bousquet, P.A. Molecular recognition of gangliosides and their potential for cancer immunotherapies. *Front. Immunol.* **2014**, *5*, 325.

© 2015 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/4.0/>).

Annexe 2



1 Article

2 **ST6GALNAC5** expression decreases the interactions 3 between breast cancer cells and the human blood- 4 brain barrier

5 Aurore Drolez¹, Elodie Vandenhautte¹, Clément P. Delannoy², Justine H. Dewald², Fabien
6 Gosselet¹, Romeo Cecchelli¹, Sylvain Julien³, Marie-Pierre Dehouck¹, Philippe Delannoy¹ and
7 Caroline Mysiorek^{1,*}

8 ¹ Université d'Artois (UArtois), EA2465, LBHE, Lens, F-62300, France; aurore.drolez@univ-artois.fr (AD);
9 elodie.vandenhautte@univ-artois.fr (EV); fabien.gosselet@univ-artois.fr (FG); romeo.cicchelli@univ-artois.fr
10 (RC); mpierre.dehouck@univ-artois.fr (MPD); caroline.mysiorek@univ-artois.fr (CM).

11 ² Structural and Functional Glycobiology Unit, UMR CNRS 8576, University of Lille, Villeneuve d'Ascq,
12 France; cl-ment.delannoy@etudiant.univ-lille1.fr (CPD); justine.dewald@etudiant.univ-lille1.fr (JHD);
13 philippe.delannoy@univ-lille1.fr (PD).

14 ³ Cell Plasticity and Cancer, U908 INSERM, University of Lille, Villeneuve d'Ascq, France;
15 sylvain.julien@univ-lille1.fr (SJ).

16 * Correspondence: caroline.mysiorek@univ-artois.fr; Tel.: +33-321-791-746

17 Academic Editor: Prof. Dr. Cheorl-Ho Kim

18 Received: date; Accepted: date; Published: date

19 **Abstract:** *ST6GALNAC5* gene that encodes an α 2,6-sialyltransferase involved in the biosynthesis of
20 α -series gangliosides, was previously identified as one of the genes that mediate breast cancer
21 metastasis to the brain. We have shown that the expression of *ST6GALNAC5* in MDA-MB-231 breast
22 cancer cells resulted in the expression of $G_{D1\alpha}$ ganglioside at the cell surface. By using a human
23 blood-brain barrier *in vitro* model recently developed, consisting in CD 34⁺ derived endothelial cells
24 cocultivated with pericytes, we show that *ST6GALNAC5* expression decreased the interactions
25 between the breast cancer cells and the human blood-brain barrier.

26 **Keywords:** breast cancer; blood-brain barrier; gangliosides; $G_{D1\alpha}$; *ST6GALNAC5*; sialyltransferase;
27 brain metastasis.

29 1. Introduction

30 The modification of cell surface glycosylation is one of the most important phenotypic
31 rearrangements that occur during carcinogenesis. It mainly affects the terminal part of the
32 carbohydrate moiety of glycoproteins and glycolipids, leading to the expression of tumor-associated
33 carbohydrate antigens (TACA). Most of TACA are sialylated and changes in sialylation were clearly
34 demonstrated to affect cellular recognition, cell adhesion and signaling, and consequently the cell's
35 behavior. Gangliosides are glycosphingolipids (GSLs) carrying one or several sialic acid residues.
36 They are essentially located on the outer leaflet of the plasma membrane where they can interact with
37 transmembrane receptors or signal transducers involved in cell proliferation, adhesion and motility.
38 In adult, complex gangliosides from b- and c-series are normally restricted to the nervous system but
39 a re-expression of complex gangliosides is observed in a variety of cancers including neuro-ectoderm-
40 derived cancers, non-small cell lung carcinoma and breast cancer [1]. In particular, G_{D3} and G_{D2} are
41 considered as melanoma- and neuroblastoma-associated antigens playing a key role in tumor
42 development, and are used as targets for cancer immunotherapy [2]. However, the mechanisms by
43 which tumor-associated gangliosides induce invasive and metastatic phenotypes of tumor cells
44 remain to be clarified.

45 α -Series gangliosides define a particular sub-class of GSLs containing Neu5Ac α 2,6-linked to the
46 GalNAc residue of the gangliopentaosyl backbone Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc
47 (IV³Neu5Ac₁Gg₄). The typical α -series ganglioside G_{D1 α} (IV³Neu5Ac₁,III⁶Neu5Ac₁Gg₄-Cer) was first
48 isolated as a minor compound from rat hepatoma cells [3] and from bovine brain [4], with an
49 expression restricted to particular cell populations of the brain and cerebellum [5]. Three members of
50 the CMP-Neu5Ac: β -N-acetylgalactosaminide α 2,6-sialyltransferase family (ST6GalNAc III, V and
51 VI) were shown to catalyze *in vitro* the transfer of a sialic acid residue onto G_{M1b} (IV³Neu5Ac₁Gg₄-Cer)
52 to form G_{D1 α} [6]. However, according to its substrate specificity and expression pattern, ST6GalNAc
53 V is considered as the main G_{D1 α} synthase. *ST6GALNAC5* cDNA was cloned from mouse brain [7, 8]
54 and *st6galnac5* gene is specifically expressed in mouse brain tissues, mostly in forebrain and
55 cerebellum [8]. When expressed as a soluble recombinant protein, the mouse ST6GalNAc V showed
56 α 2,6-sialyltransferase activity almost exclusively for G_{M1b}, while being inactive toward glycoproteins
57 [7]. The enzymatic activity of human ST6GalNAc V was never investigated in details but we recently
58 shown that transfection of human ST6GalNAc V cDNA into MDA-MB-231 breast cancer cells resulted
59 in the expression of G_{D1 α} at the cell surface [9].

60 To date, the specific function of α -series gangliosides is poorly understood. It has been proposed
61 that G_{D1 α} could play a role in Purkinje cell functions in the cerebellum [5] and that G_{D1 α} could serve
62 as an adhesion molecule for high-metastatic murine lymphosarcoma cells in the adhesion to hepatic
63 endothelial cells [10]. Recently, *ST6GALNAC5* was identified as one of the genes over-expressed in
64 breast cancer cell populations selected for their ability to produce brain metastases [11]. ShRNA
65 inhibition of *ST6GALNAC5* expression reduced the capacity of breast cancer cells to produce brain
66 metastases whereas the expression of *ST6GALNAC5* in parental cell lines promoted brain metastases
67 formation [11]. Moreover, *ST6GALNAC5* was shown to improve the capacity of breast cancer cells to
68 transmigrate across a human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) *in vitro* model of the blood-
69 brain barrier [11].

70 The blood-brain barrier (BBB), localized at the level of brain capillary endothelial cells (ECs),
71 controls and restricts the exchanges between the blood and the brain tissues. The BBB presents a
72 specific architecture where the capillary ECs share a split basement membrane with pericytes and are
73 surrounded together by astrocyte end-feet. The BBB forms with pericytes, neurons, glial cells and the
74 extracellular matrix, the neurovascular unit (NVU). The interplays and communications between the
75 different components of NVU allow the BBB-specific differentiation of ECs, which exhibit a network
76 of tight junctions, express efflux pumps and specific receptors and transporters. These specific and
77 restrictive properties control and limit the access to the brain parenchyma of many cells and
78 substances. During the last decades, most *in vitro* BBB models were developed using animal cells
79 (mouse, rat, bovine, pig) isolated from brain microvessels as primary culture or immortalized [12]
80 whereas human culture models commonly use HUVECs, which display only a limited tightness and
81 not a BBB phenotype.

82 *In vitro* approaches are required to identify cellular and molecular interactions between cancer
83 cells and BBB endothelium. However, while numerous studies were performed with *in vitro* models,
84 the heterogeneity and the quality of BBB models used is a limitation to the extrapolation of results to
85 *in vivo* context, showing that the choice of a model that fulfills the properties of human BBB is
86 essential.

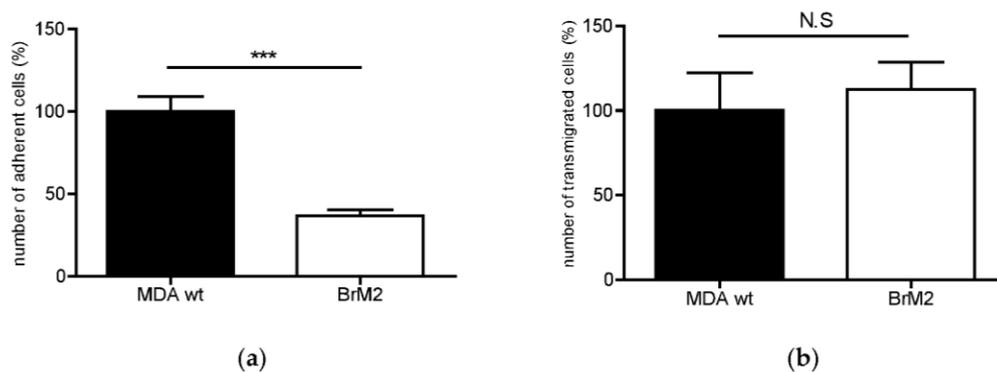
87 In that context, we recently developed a human BBB *in vitro* model consisting in CD34⁺
88 hematopoietic stem cells derived endothelial cells cocultivated with brain pericytes [13, 14] and
89 displaying improved BBB properties closed to those observed *in vivo*. The model proved valuable in
90 the study of cancer cells tropism as the adhesion and transmigration capacities of breast cancer cells
91 were found to be in accordance with the cancer cell molecular subtypes, fitting well with their
92 propensity to form brain metastases [15, 16]. We have used this CD 34⁺ derived human BBB model to
93 investigate the role of G_{D1 α} in adhesion and transmigration of breast cancer cells and contrary to what
94 was observed on HUVECs *in vitro* model, *ST6GALNAC5* cDNA expression resulted in a decrease of
95 the interactions between MDA-MB-231 breast cancer cells and the CD 34⁺ derived human BBB model.

96 2. Results

97 2.1. Brain targeting cells interaction analysis on the human *in vitro* BBB model

98 In order to investigate the mechanisms of brain tropism during the initial steps of breast cancer
 99 brain metastases formation, the interactions of breast cancer cells with the BBB were analyzed using
 100 an *in vitro* approach. For that purpose, adhesion and transmigration assays of brain targeting breast
 101 cancer cells were performed on a human BBB *in vitro* model named Brain-Like endothelial Cells
 102 (BLECs) that we recently developed [13, 14]. BLECs model consists in endothelial cells derived from
 103 CD34⁺ hematopoietic stem cells cocultivated with brain pericytes. The BLECs model displays
 104 improved BBB properties closed to those observed *in vivo* such as low permeability to BBB integrity
 105 marker, continuous localization at the cell border of tight junction proteins (Claudin-5, occludin, ZO-
 106 1), expression of functional efflux pumps (P-gP, BCRP) [13, 14].

107 The adhesion and transmigration of MDA-MB 231 BrM2 cell line (BrM2) was compared to the
 108 parental cell line MDA-MB-231 wt. The BrM2 cell line was previously generated by 2 rounds of *in*
 109 *vivo* selection in mouse, and showed a significant increase in brain metastases formation [11]. As
 110 shown in Figure 1a, after two hours of incubation, the adhesion rate of BrM2 on the BBB ECs was
 111 63.4% lower than the parental cells and no increase in BBB permeability to LY was observed for MDA
 112 and BrM2 ($0.57 \pm 0.08 \cdot 10^{-3} \text{ cm}\cdot\text{min}^{-1}$ and $0.66 \pm 0.1 \times 10^{-3} \text{ cm}\cdot\text{min}^{-1}$ respectively) compared to the control
 113 condition before adhesion ($Pe = 0.58 \pm 0.07 \times 10^{-3} \text{ cm}\cdot\text{min}^{-1}$). As the adhesion of breast cancer cells on
 114 the BBB ECs is required but not enough to reach the brain parenchyma, the transmigration was
 115 quantified and revealed that the BrM2 transmigrate at the same rate compared to the parental cell
 116 line MDA-MB-231 wt (Figure 1b). No increase in BBB permeability to LY was measured following
 117 transmigration of MDA and BrM2 ($0.73 \pm 0.03 \times 10^{-3} \text{ cm}\cdot\text{min}^{-1}$ and $0.78 \pm 0.01 \times 10^{-3} \text{ cm}\cdot\text{min}^{-1}$
 118 respectively) compared to the control condition without transmigration.



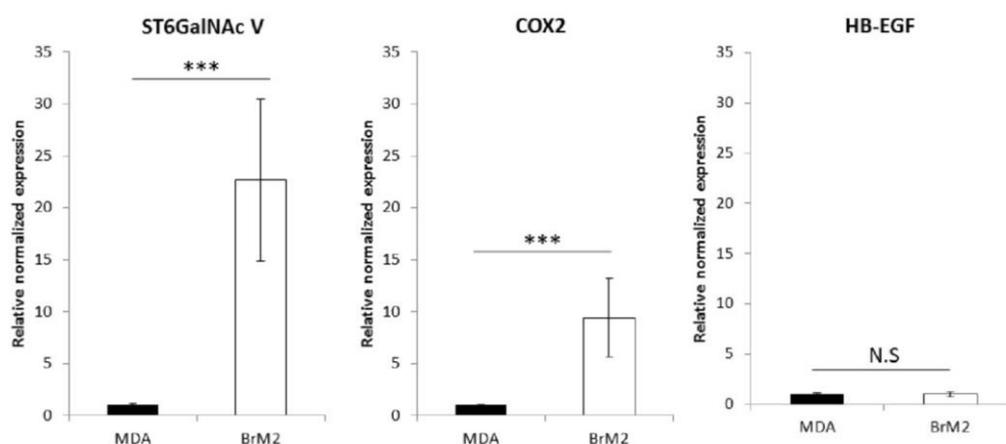
119 **Figure 1.** Adhesion (a) and transmigration (b) of MDA-MB-231 wt and BrM2 breast cancer cell lines
 120 on the human BLECs model. The number of adherent or transmigrated MDA-MB-231 wt cells was
 121 set up to 100% and equal to, respectively, 579 and 98 cells. Results are mean of triplicate and
 122 representative of two independent experiments N.S: not significant; ***: $p < 0.001$.

123 2.2. Molecular characterization of MDA-MB-231 BrM2 cells.

124 The BrM2 cell line was previously described to over-express a set of genes potentially involved
 125 in brain metastasis, including *COX2*, *HBEGF* and *ST6GALNAC5* [11]. The expression of these genes
 126 was quantified by qPCR. As shown in Figure 2, a 23-fold increased expression of *ST6GALNAC5* and
 127 10-fold increase of *COX2* were measured in BrM2 compared to parental MDA-MB-231 wt. However,
 128 no difference of expression was measured for HB-EGF in BrM2 compared to parental MDA-MB-231
 129 wt.

130 *ST6GALNAC5* gene encodes a GalNAc α 2,6-sialyltransferase involved in the biosynthesis of α -
 131 Series gangliosides, mainly G_{D1a} . According to the fact that G_{D1a} could serve as an adhesion molecule
 132 for breast cancer cells in the adhesion to BBB endothelial cells and promote brain metastasis, the GSL
 133 composition was analyzed to determine the impact of the increased *ST6GALNAC5* expression on the

134 glycosylation of MDA-MB-231 BrM2 cells. Total GSLs were extracted from MDA-MB-231 wt and
 135 BrM2, purified by reverse phase chromatography and permethylated prior to MALDI-MS analysis.



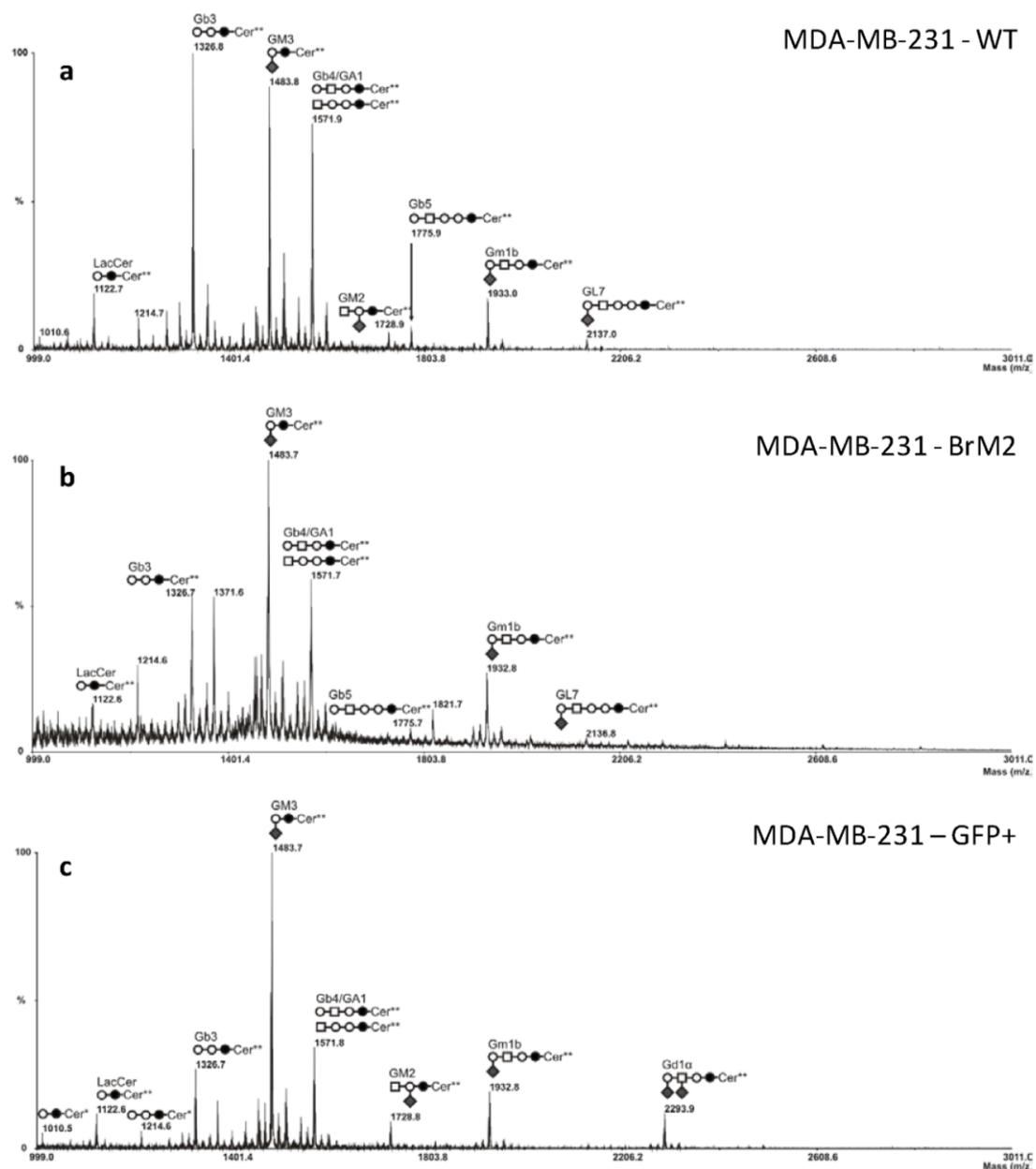
136

137 **Figure 2.** qPCR analysis of *COX2*, *HB-EGF* and *ST6GALNAC5* in MDA-MB-231 wt and BrM2.
 138 Quantification was performed by the method described by Pfaffl [17] and normalized to Actin. N.S.:
 139 Non Significant; ***: $p < 0.001$

140 As previously shown [18] MDA-MB-231 wt expresses neutral globosides G_{b3} and G_{b4} and
 141 monosialylated gangliosides, mainly G_{M3} (Figure 3a). The precursor lactosylceramide (LacCer) was
 142 also detected, as well as a monosialoganglioside at m/z 1933, which was confirmed to correspond to
 143 G_{M1b} by MALDI-TOF/TOF fragmentation analysis (data not shown). Two ceramide isoforms are
 144 commonly expressed in human tissues due to the substitution of the sphingosine moiety by palmitic
 145 acid C16:0 (Cer*) or lignoceric acid C24:0 (Cer**). As shown in Figure 3b, the composition in GSLs of
 146 BrM2 cells was similar to wt cells and no expression of $G_{D1\alpha}$ was detected as indicated by the absence
 147 of signal at m/z 2293.9, which was identified in MDA-MB-231 GFP+ cell population (Figure 3c) by
 148 MALDI-TOF/TOF fragmentation analysis (Fig. S1).

149 2.3. Involvement of $G_{D1\alpha}$ over-expression in interaction processes of breast cancer cell lines with the BBB

150 In order to specifically identify the effect of *ST6GALNAC5* over-expression on the adhesion and
 151 transmigration of breast cancer cells, two cell populations were generated, Clone #13 and a polyclonal
 152 GFP-positive cell population in which *ST6GALNAC5* cDNA was 10-fold and 60-fold over-expressed
 153 compared to control MDA-MB 231 wt, respectively [9]. These two cell populations were previously
 154 demonstrated to express $G_{D1\alpha}$ ganglioside by MALDI-TOF/TOF fragmentation analysis (Fig. S1). The
 155 adhesion and transmigration capacities of these two cell populations were determined using the
 156 human BBB *in vitro* model. As shown in Figure 4a, the results obtained were similar to those obtained
 157 with BrM2 cells as adhesion of the Clone #13 and GFP+ cell population were 40% and 50% decreased
 158 compared to MDA-MB-231 wt, respectively. A 55% and 50% decrease of transmigration rate was also
 159 observed for Clone #13 and the GFP+ cell population, respectively. Following adhesion and
 160 transmigration assays, no increase in BBB permeability was measured for Clone #13 and GFP+ cell
 161 population ($0.87 \pm 0.03 \times 10^{-3} \text{ cm}\cdot\text{min}^{-1}$ and $0.92 \pm 0.07 \times 10^{-3} \text{ cm}\cdot\text{min}^{-1}$ respectively) compared to the
 162 control condition before transmigration ($Pe = 0.90 \pm 0.04 \times 10^{-3} \text{ cm}\cdot\text{min}^{-1}$).



163

164

165 **Figure 3.** Comparison of MS profiles of permethylated glycosphingolipids purified from MDA-MB-
 166 231 wt, BrM2 and GFP+ cell population. GSL are present as d18:1/C16:0 (Cer*) and d18:1/C24:0 (Cer**) isomers. ○, Gal; ●, Glc; □, GalNAc; ◆, Neu5Ac.

167

2.4. Does the specificity of interactions depend on cells species?

168

169

170

171

172

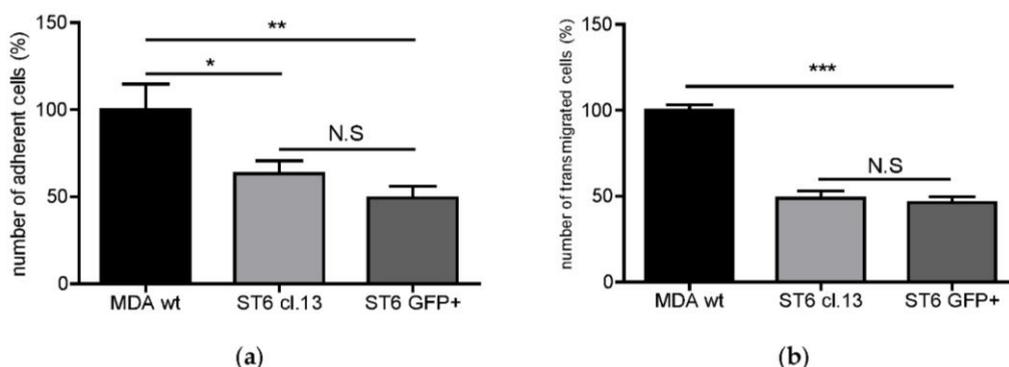
173

174

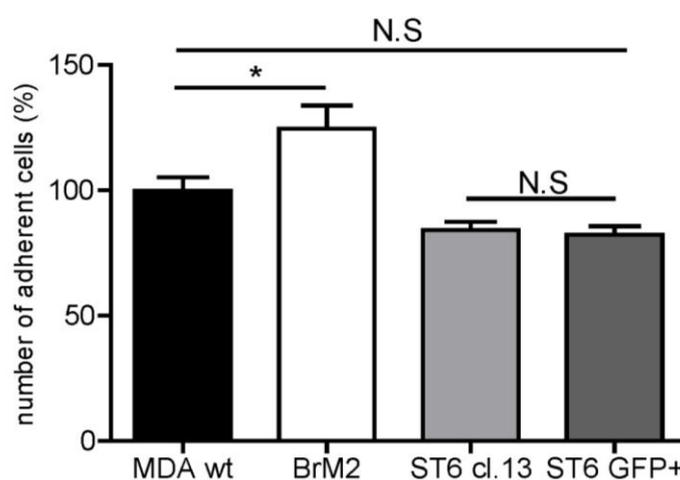
175

As the BrM2 cells were generated and selected according to their increased brain metastatic activity in immunodeficient mice, a mouse-specific molecular mechanism of interaction could take place between human breast cancer cells and murine brain endothelial cells. Hence, in order to determine if the capacity of interaction could be modified according to the species, we measured adhesion of breast cancer cells on a mouse BBB *in vitro* model. As shown in Figure 5, after two hours of incubation, a significant 25% increase in adhesion was observed for BrM2 cells compared to control MDA-MB-231 wt. However, no increase of adhesion was measured for ST6GalNAc V over-expressing cells, clone #13 and GFP+ cell population. Following adhesion assay of cancer cell

176 populations, no increase in BBB permeability was measured ($0.47 \pm 0.1 \times 10^{-3} \text{ cm}\cdot\text{min}^{-1}$) compared to
 177 the control condition before adhesion ($P_e = 0.36 \pm 0.12 \times 10^{-3} \text{ cm}\cdot\text{min}^{-1}$).



178 **Figure 4.** Adhesion (a) and transmigration (b) of MDA-MB-231wt, Clone #13 (ST6 cl. 13) and GFP+
 179 breast cancer cell population (ST6 GFP+) on the human BLECs model. The number of adherent or
 180 transmigrated MDA-MB-231 wt cells was set up to 100% and equal to, respectively, 533 and 117 cells.
 181 Results are mean of triplicate and representative of two or three independent experiments. N.S: not
 182 significant; *: $p < 0.01$; **: $p < 0.005$; ***: $p < 0.001$.



183

184 **Figure 5.** Adhesion of MDA-MB-231wt, BrM2, Clone #13 and GFP+ breast cancer cell populations on
 185 a mouse BBB model. The number of adherent or transmigrated MDA-MB-231 wt cells was set up to
 186 100% and equal to 286 cells. Results are mean of triplicate and representative of two independent
 187 experiments. N.S: not significant; *: $p < 0.1$.

188 3. Discussion

189 With the improvement of cancer therapeutic strategies to treat systemic disease, the incidence of
 190 brain metastases has raised. Brain metastases (BM) represent the most frequent intracranial tumors
 191 in adults. Breast cancer is after lung cancer, the second type of cancer which has the highest incidence
 192 to develop metastasis in the brain; about 30% of women with breast cancer developing metastases to
 193 the brain. To form metastases in distant organs, cancer cells from the primary tumor have to
 194 successfully achieve the multistep process of metastatic cascade that includes the escape from the
 195 primary tumor, the survival in the circulation, the interactions with the vascular wall of the targeted
 196 organ, the extravasation through the endothelial cell layer and finally the adaptation to the host
 197 environment.

198 In the case of brain metastases, the cancer cells have also to interact and cross the highly
199 restrictive and specific BBB, localized at the level of brain capillary endothelial cells. This barrier
200 maintains the brain homeostasis thanks to specific properties that limit the access to the brain
201 parenchyma. In the therapeutic strategy against BM, besides the surgical resection and radiotherapy,
202 the chemotherapy plays an underlying role with a limited efficacy mainly attributed to the BBB. In
203 this context, the understanding the biology is prime of important for both the prediction of patients
204 with high risk to develop BM and the discovery of new drug targets [19].

205 For breast cancer patients, the risk to develop BM is associated with the breast cancer molecular
206 subtypes, which are described to have different clinical behaviors. In this context, analyses of cellular
207 and molecular events are performed during the metastatic cascade in order to better understand the
208 behavior of breast cancer cells and to identify a molecular signature that could predict the risk of
209 brain metastases. The widely used experimental strategy consists of the transcriptional profiling of
210 cancer cells following multiple cycles of injection in rodents and a comparison with the molecular
211 profile obtained from brain metastases clinical samples. This experimental procedure was used by
212 Bos *et al.* [11] in order to generate a brain targeting breast cancer cell line named BrM2, deriving from
213 the triple negative breast cancer cell line MDA-MB-231. The gene encoding the ganglioside specific
214 sialyltransferase ST6GalNAc V was one of the genes whose expression was up-regulated in BrM2
215 and was identified as a potential mediator for cancer cells transmigration through an endothelial *in*
216 *vitro* barrier model using HUVECs. Here, using our well characterized human BBB *in vitro* model, we
217 clearly demonstrate a decreased adhesion and no change in transmigration of BrM2 cells compared
218 to control. These results are not line with the data from Bos *et al.* who previously showed that the
219 expression of *ST6GALNAC5* cDNA was sufficient to increase the transmigration activity of MDA-
220 MB-231 BrM2 cells through HUVECs BBB *in vitro* model [11].

221 As a matter of fact, the phenotype of endothelial cells used in the *in vitro* approach is of prime
222 importance to study cellular and molecular interactions occurring at the level of the BBB, in order to
223 specifically identify the mechanisms occurring at this particular interface as previously described
224 [15]. Hence, the use of endothelial cells without a validated BBB phenotype, can generate data that
225 cannot be correlated with the *in vivo* situation.

226 *In vitro*, ST6GalNAc V is known to catalyze the transfer of a sialic acid residue onto G_{M1b} to form
227 $G_{D1\alpha}$ [6] and is considered as the main enzyme for the biosynthesis of α -Series gangliosides, the
228 expression of which being normally restricted to the brain [5]. Interestingly, it has been recently
229 shown that $G_{D1\alpha}$ could serve as an adhesion molecule for high-metastatic murine lymphosarcoma
230 cells in the adhesion to hepatic endothelial cells [10]. Similarly, the expression of $G_{D1\alpha}$ at the cell
231 surface of breast cancer cells could improve their capacity to interact with brain capillary endothelial
232 cells. We also used a cell line deriving from parental MDA-MB-231 by transfection of human
233 *ST6GALNAC5* cDNA and over-expressing ST6GalNAc V. Our experiments have revealed that the
234 over-expression of the active form of ST6GalNAc V associated with the expression of $G_{D1\alpha}$ at the cell
235 surface display a reduced capacity of interaction and transmigration on the human BBB *in vitro*
236 model. These results were similar to those we obtained with BrM2 cells indicating that the over-
237 expression of ST6GalNAc V decreased the amount of breast cancer cells able to interact with the BBB
238 ECs.

239 Nevertheless, as *ST6GALNAC5* gene encodes a sialyltransferase involved in the biosynthesis of
240 gangliosides and should therefore modify the cell surface glycosylation, mass spectrometry analysis
241 was performed on BrM2 cells in order to identify a change in GSLs composition potentially involved
242 in the interaction of breast cancer cells with the BBB. Surprisingly, no difference in GSLs content was
243 observed compared to the parental MDA-MB-231 cells whereas BrM2 cells express the substrate of
244 ST6GalNAc V. These results allowed us to assume that the expression of *ST6GALNAC5* in BrM2 does
245 not lead to a functional enzyme that modulates the GSLs content. At least, as the BrM2 cells were
246 generated in mouse and considering that cancer cell can develop a host adaptation to maximize their
247 colonizing properties, we analyze the adhesion of BrM2 and ST6GalNAc V over-expressing cells on
248 a mouse BBB *in vitro* model. Our results revealed that the adhesion of BrM2 is increased on mouse
249 BBB endothelial cells compared to the ST6 GFP+ and CL#13, indicating that the cells generated in

250 mouse display an increase of interaction contrary to the cells in which *ST6GALNAC5* cDNA was
251 transfected. Environment adaptation is a well-known mechanism and the adaptation of breast cancer
252 cells to the murine environment could explain at least in part the increased adhesion of BrM2 cells on
253 a mouse BBB *in vitro* model. However, this result is difficult to correlate with the fact that the
254 expression of *ST6GALNAC5* cDNA in BrM2 MDA-MB-231 increased the transmigration of cells
255 through HUVECs [11]. Hence our experimental approach highlighted that ST6GalNAc V does not
256 seem to be a mediator that increases breast cancer cell interaction with the human BBB. In addition,
257 the expression of ST6GalNAc V in cancer cells is not directly correlated with the expression of its
258 product $G_{D1\alpha}$ that is depending on the presence of the precursor G_{M1b} . As the expression of
259 ST6GalNAc V is normally restricted to the brain, the expression of the enzyme in cancer cells seems
260 particularly suitable for the development of tumors in the brain parenchyma. However, it was
261 recently shown that using specific monoclonal antibodies reactive with $G_{D1\alpha}$ or G_{M1b} that only few
262 human cancer cell lines show significant expression of these gangliosides [20]. These antibodies could
263 be used in a near future to determine the expression of these gangliosides in breast cancer tumors as
264 well as the implication of $G_{D1\alpha}$ in the formation of breast cancer cell metastases.

265 4. Materials and Methods

266 4.1. Human BLECs BBB *in vitro* model

267 4.1.1. CD34⁺ cells differentiation from human umbilical cord blood

268 Endothelial cells were derived from CD34⁺-cells isolated from human umbilical cord blood
269 according to the method described by Pedroso *et al.* [21]. It required the collection of human umbilical
270 cord blood: infants' parents signed an informed consent form in compliance with the French
271 legislation. The protocol was approved by the French Ministry of Higher Education and Research
272 (CODECOH Number DC2011-1321). All experiments were carried out in accordance with the
273 approved protocol. CD34⁺-cells were cultivated on 1% gelatin-coated 24-wells plates (Corning Inc.,
274 New York, USA) in ECM medium (Sciencell, Carlsbad, CA, USA) containing 20% of heat inactivated
275 fetal calf serum (FCS from GIBCO, Life Technology, SAS Saint Aubin, France) and 50 ng/mL of
276 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF from PreproTech Inc. Rocky Hill, USA). After 5 days, time
277 necessary for CD34⁺-cells adhesion, the medium was changed every two days. After 15-20 days,
278 CD34⁺-cells started to differentiate into ECs. ECs were treated with trypsin and cultivated on 1%
279 gelatin-coated 100 mm Petri dish in ECM medium containing 5% heat inactivated FCS and 50 µg/mL
280 gentamicin (Biochrom AG, Berlin, Germany).

281 4.1.2. Pericyte culture

282 Pericytes, isolated from bovine brain capillaries, were cultivated in Dulbecco's Modified Eagle's
283 Medium (DMEM) supplemented with 20% heat inactivated FCS, 2 mM L-glutamine (Merck
284 Chemicals, Darmstadt, Germany), 50 µg/mL gentamicin and 1 ng/mL basic fibroblast growth factor
285 (bFGF). The pericyte culture, confluent after 2 days, was dissociated using trypsin-EDTA (Ethylene
286 Diamine TetraAcetic acid) solution (Biochrom AG, Berlin, Germany) and cells were seeded on 12-
287 wells plates (5×10^4 cells/cm²). The phenotype of the pericytes was characterized according to
288 Vandenhoute *et al.* [22].

289 4.1.3. Co-culture

290 CD34⁺ derived endothelial cells (CD34⁺-ECs) were treated with trypsin-EDTA solution and
291 seeded on Matrigel™ (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) coated filters (Costar Transwell inserts,
292 pore size 0.4 µm or 3 µm, 12-well format, Corning Inc., New York, USA) (8×10^4 cells/cm²). Filters
293 were firstly cultivated alone during 6 days without medium in the lower compartment. Then, filters
294 were placed above wells containing pericytes. The co-culture medium, ECM supplemented with 5%
295 heat inactivated FCS and 50 µg/mL gentamicin, was changed every 2 days. After 6 days of co-culture,
296 the model was stable and ready for experiment [13].

297 4.2. Murine BBB *in vitro* model

298 In accordance with the French legislation the animal house of the Université d'Artois get
299 approval from the protecting population departmental directorate under number B62-498-5. In
300 compliance with the new European directive (Directive 2010/63/EU), all the procedures were
301 submitted to the ethics committee (comité d'éthique en experimentation animale Nord - Pas-de-
302 Calais; C2EA 75) and the French Ministry (ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche:
303 direction générale pour la recherche et l'innovation) for authorization, were approved and referenced
304 under the number 2015090115412152.

305 Mice (C57Bl6/J) were supplied by Laboratoire Janvier (Le Genest-Saint-Isle, France) and housed
306 in a temperature-controlled pathogen-free room with light from 07:00 to 19:00 (daytime) and had free
307 access to food and water and live in an enriched environment.

308 Endothelial cells were extracted from mice brain microvessels using the method described by
309 Coisne *et al.* [23] and seeded on Matrigel™-coated filters (Costar Transwell 0.4 µm, 12-well format).
310 All experiments were performed within the framework of the French legislation that controls animal
311 experimentation. Cells were cultivated until confluence in DMEM medium 5% heat inactivated CS,
312 2 mM L-glutamine, 50 µg/mL gentamicin and 1 ng/mL bFGF. This medium was changed every day.
313 ECs form a confluent monolayer and were used for experiment after 5 days.

314 4.3. Human Breast cancer cell lines culture

315 Breast cancer cell lines MDA-MB-231 (HTB-26, ATCC®, Manassas, VA, USA), MDA-MB-231
316 clone #13 and GFP+ *ST6GALNAC5* transfected cells [9] and MDA-MB-231 BrM2 [11] cells were
317 cultivated in DMEM medium with 4.5 g/L D-glucose, 10% heat inactivated FCS, 2 mM L-glutamine
318 and 5 µg/mL penicillin-streptomycin. Cells were cultivated 3 weeks before being used in adhesion or
319 transmigration experiment.

320 4.4. Adhesion and transmigration assays

321 4.4.1. Cancer cells staining

322 In order to visualize cancer cells at the end of the adhesion and transmigration kinetics, the cells
323 were previously loaded with a fluorescent CellTracker™ (Invitrogen, Carlsbad, USA). The cancer cells
324 were incubated with the compound (diluted at 10 µM in DMEM) during 40 minutes at 37°C. The
325 medium was then removed and after one washing step with DMEM, replaced by complete medium
326 for a minimum of 45 minutes.

327 4.4.2. Adhesion assay

328 First, cancer cells were treated with EDTA and mechanically dissociated in complete medium
329 containing only 1% heat inactivated FCS. Then, the cancer cells were seeded (2×10^4) on filters
330 containing ECs monolayer. After 120 minutes, the supernatant was gently removed and filters were
331 rinsed with DMEM. Filters were then fixed with 4% paraformaldehyde solution for 10 minutes.
332 After the staining of nuclei with Hoechst 33358 (BisBenzimide, MP Biochemicals, Irvine, CA, USA),
333 the filters were mounted using Mowiol solution containing DABCO (1,4-Diazobicyclo-(2.2.2-octane))
334 as an anti-fading agent.

335 4.4.3. Transmigration assay

336 Using the same protocol, cells were seeded (8×10^4) on filters containing endothelial monolayers.
337 After 16 hours, filters were fixed for 10 min using 4% paraformaldehyde at room temperature, the
338 nuclei were stained with Hoechst 33358 and the filters were placed upside down on glass slides.
339 Samples were finally mounted under coverslips with Mowiol containing DABCO.

340 4.4.4. Results and statistics

341 Adherent and transmigrated cancer cells were manually counted on the total surface of each
342 filter under Leica DMR fluorescence microscope (Leica Microsystem, Wetzlar, Germany). In the
343 interest of clarity, the number of adherent or transmigrated MDA-MB-231 on each model was set to
344 100%. All results were expressed as mean \pm SEM from two or more independent experiments.
345 Statistical significance was assessed by t-test. All statistical analyses were performed using GraphPad
346 Prism version 5.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, California, USA).

347 4.5. BBB permeability measurement

348 BBB ECs permeability was measured according to the method described by Dehouck *et al.* [24].
349 Diffusion of a hydrophilic molecule, Lucifer Yellow (LY, lucifer yellow CH dilithium salt, Sigma-
350 Aldrich) or [¹⁴C]-saccharose (1 μ Ci/mL, MM = 342) (Amersham Biosciences, Piscataway, USA) that
351 poorly cross the BBB was measured and used as integrity markers. Filters containing ECs were placed
352 in wells containing 1.5 mL Ringer-Hepes solution (RH) (150 mM NaCl, 5.2 mM KCl, 2.2 mM CaCl₂,
353 0.2 mM MgCl₂·6H₂O, 6 mM NaHCO₃, 5 mM HEPES, pH 7.4). After filters transfer, 0.5 mL of RH
354 containing 50 μ M of LY or [¹⁴C]-saccharose at 0.1 μ Ci/ mL was added to the upper compartment. After
355 different time points (15, 30, 45 and 60 minutes), filters were placed in a new well containing RH. An
356 aliquot of 200 μ L from the lower compartment at each time point and an aliquot of 20 μ L from the
357 initial solution of LY (Synergy H1, ThermoLabsystems, Issy-les-Moulineaux, France) or [¹⁴C]-
358 saccharose (liquid scintillation counter Packard Tricarb 2100 TR, Perkin Elmer, Courtaboeuf, France)
359 were used for quantification. The endothelial permeability coefficient of LY and [¹⁴C]-saccharose were
360 calculated as described by Siflinger-Birnboim *et al.* [25]. To obtain a concentration-independent
361 transport parameter, the clearance principle was used. Briefly, the average volume cleared is plotted
362 versus time, and the slope is estimated by linear regression. Both insert permeability (PS_f, for insert
363 only coated with Matrigel™) and insert plus endothelial cell permeability (PS_t, for insert with
364 Matrigel™ and cells) were taken into consideration, according to the following formula: $1/PS_e =$
365 $1/PS_t - 1/PS_f$. The permeability value for the endothelial monolayer was then divided by the surface
366 area of the porous membrane of the insert (membrane surface 1.12 cm²) to obtain the endothelial
367 permeability coefficient (Pe) of the molecule (in cm/min).

368 4.6. mRNA extraction and PCR analysis

369 Cancer cells were lysed with 500 μ L of RLT lysis buffer (Qiagen). mRNA was purified using the
370 RNeasy total RNA extraction kit (Qiagen), following the manufacturer's instructions. After this step,
371 the mRNA's purity and concentration were assessed by measuring the absorbance at 260, 280, and
372 320nm using the Take 3 microplate reader protocol (Synergy™ H1, Biotek).

373 For each condition, cDNAs were obtained from 0.5 μ g of mRNA using iScript™ Reverse
374 Transcription Supermix (BioRad, Marnes-la-Coquette, France), according to the manufacturer's
375 instructions. Real-time PCR experiments were performed using the Sso Fast EvaGreen Master Mix
376 kit (BioRad). Primers for *ACTB* (sense: 5'-ggagcacagagcctgcctt-3', antisense: 5'-acatgccggagccgtgtgcg-
377 3'), *ST6GALNAC5* (sense: 5'-ggatccaatcaccttcag-3', antisense: 5'-tagcaagtgattctggttcca-3'), *COX2*
378 (sense: 5'-tccaccaacttacaatgctgac-3', antisense: 5'-cacaggaggaaggctctagta-3') and *HBEGF* (sense: 5'-
379 ggttaccatggagagaggtgtc-3', antisense: 5'-gaccagcagacagacagatgac-3') were designed using Primer 3
380 software. For each primer, amplification was carried out for 40 cycles with an annealing temperature
381 of 60°C in a CFX96 thermocycler (BioRad). The efficiency was calculated for each primer pair (CFX
382 Manager, BioRad). Melting curve analysis was performed after the amplification cycles, in order to
383 check the specificity/purity of each amplification. Gene expression levels were evaluated according
384 to the $\Delta\Delta C_t$ method and normalized against Actin expression.

385 4.7. Extraction and Preparation of Glycolipids

386 Twenty dishes (10 cm diameter) of cultured cells were washed twice with ice-cold PBS and cells
387 were sonicated on ice in 200 μ L of water. The resulting material was dried under vacuum and
388 sequentially extracted by CHCl₃/CH₃OH (2:1, v/v), CHCl₃/CH₃OH (1:1, v/v) and CHCl₃/CH₃OH/H₂O

389 (1:2:0.8, v/v/v) using intermediary centrifugations at 2.500 g for 20 min. Supernatants were pooled,
390 dried and subjected to a mild saponification in 0.1 M NaOH in CHCl₃/CH₃OH (1:1) at 37°C for 2 h
391 and then evaporated to dryness [26]. Samples were reconstituted in CH₃OH/0.1% TFA in H₂O (1:1,
392 v/v) and applied to a reverse phase C₁₈ cartridge (Waters, Milford, MA, USA) equilibrated in the same
393 solvent. After washing with CH₃OH/0.1% TFA in H₂O (1:1, v/v), GSL were eluted by CH₃OH,
394 CHCl₃/CH₃OH (1:1, v/v) and CHCl₃/CH₃OH (2:1, v/v). The elution fraction was dried under nitrogen
395 stream.

396 4.8. Mass Spectrometry Analysis of GSLs

397 Prior to mass spectrometry analysis, GSL were permethylated according to Ciucanu and Kerek
398 [27]. Briefly, compounds were incubated 2 h in a suspension of NaOH in dry DMSO (400 µL) and
399 CH₃I (200 µL). The methylated derivatives were extracted in CHCl₃ and washed several times with
400 water. The reagents were evaporated and the sample was dissolved in CHCl₃ in the appropriate
401 dilution. MALDI-MS and MS/MS analyses of permethylated GSL were performed on 4800
402 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA) mass spectrometer, operated in
403 the positive reflectron mode. For MS acquisition, 5 µL of diluted permethylated samples in CHCl₃
404 were mixed with 5 µL of 2,5-dihydroxybenzoic acid matrix solution (10 mg/mL dissolved in
405 CHCl₃/CH₃OH (1:1, v/v)). The mixtures (2 µL) were then spotted on the target plate and air dried.
406 MS survey data comprises a total of 50 sub-spectra of 3.000 laser shots. Peaks observed in the MS
407 spectra were selected for further MS/MS. CID MS/MS data comprises a total of 100 sub-spectra of
408 3000 laser shots. Two or more spectra can be combined post-acquisition with mass tolerance set at 0.1
409 Da to improve S/N ratio. The potential difference between the source acceleration voltage and the
410 collision cell was set to 1 kV and argon was used as collision gas.

411 **Supplementary Materials:** The following are available online at www.mdpi.com/link, Figure S1: MALDI-
412 TOF/TOF identification of G_{D1α} ganglioside in MDA-MB 231 cell population expressing ST6GALNAC5 cDNA.

413 **Acknowledgments:** This work was supported by the University of Lille, the Artois University, the CNRS, the
414 comité du Pas-de-Calais de La Ligue contre le Cancer and La Région Nord-Pas-de-Calais (fellowship Drolez A
415 and Vandenhautte E). We thank the Dr. Joan Massagué from the Memorial Sloan Kettering Cancer Center for
416 providing us the MDA-MB-231BrM2 cell line.

417 **Author Contributions:** A.D. performed the experiments, analyzed the data and participated to the redaction;
418 E.V., C.P.D. performed the experiments and analyzed the data; J.H.D. performed the experiments; F.G., R.C.,
419 M.P.D. contributed reagents/materials/analysis tools; S.J. participated to design the experiments; P.D., C.M.
420 conceived and designed the experiments, analyzed the data and wrote the manuscript.

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

422 Abbreviations

423 The following abbreviations are used in this manuscript:

424 BBB: Blood-brain barrier

425 BLECs: Brain-like endothelial cells

426 BM: Brain metastases

427 Cer: Ceramide

428 ECs: Endothelial cells

429 GFP: Green fluorescent protein

430 GSLs: Glycosphingolipids

431 HUVECs: Human umbilical vein endothelial cells

432 LY: Lucifer Yellow

433 MALDI-TOF: Matrix assisted laser desorption-ionization time-of-flight

434 MS: Mass Spectrometry

435 NVU: Neurovascular unit

436 TACA: Tumor-associated carbohydrate antigen

437 **References**

- 438 1. Bobowski, M.; Cazet, A.; Steenackers, A.; Delannoy, P. Role of complex gangliosides in cancer progression.
439 *Carbohydr. Chem.* **2012**, *37*, 1-20.
- 440 2. Dhillon, S. Dinutuximab: first global approval. *Drugs.* **2015**, *75*, 923-927.
- 441 3. Taki, T.; Hirabayashi, Y.; Ishikawa, H.; Ando, S.; Kon, K.; Tanaka, Y.; Matsumoto, M. A ganglioside of rat
442 ascites hepatoma AH 7974F cells. Occurrence of a novel disialoganglioside (GD1 alpha) with a unique N-
443 acetylneuraminosyl (alpha 2-6)-N-acetylgalactosamine structure. *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 3075-3078. PMID:
444 3949760.
- 445 4. Hirabayashi, Y.; Hyogo, A.; Nakao, T.; Tsuchiya, K.; Suzuki, Y.; Matsumoto, M.; Kon, K.; Ando, S. Isolation
446 and characterization of extremely minor gangliosides; GM1b and GD1 alpha; in adult bovine brains as
447 developmentally regulated antigens. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 8144-8151. PMID: 2186036.
- 448 5. Furuya, S.; Irie, F.; Hashikawa, T.; Nakazawa, K.; Kozakai, A.; Hasegawa, A.; Sudo, K.; Hirabayashi, Y.
449 Ganglioside GD1 alpha in cerebellar Purkinje cells. Its specific absence in mouse mutants with Purkinje cell
450 abnormality and altered immunoreactivity in response to conjunctive stimuli causing long-term
451 desensitization. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 32418-32425. PMID: 7528216.
- 452 6. Harduin-Lepers, A. Vertebrate Sialyltransferases. In *Sialobiology: Structure, Biosynthesis and Function Sialic*
453 *Acid Glycoconjugates in Health and Disease*; Martínez-Duncker, J.T., Ed.; Bentham Science Publishers, Sharjah,
454 United Arab Emirates. 2013, pp. 139-187.
- 455 7. Okajima, T.; Fukumoto, S.; Ito, H.; Kiso, M.; Hirabayashi, Y.; Urano, T.; Furukawa, K. Molecular cloning of
456 brain-specific GD1alpha synthase (ST6GalNAc V) containing CAG/Glutamine repeats. *J. Biol. Chem.* **1999**,
457 *274*, 30557-30562. PMID: 10521438.
- 458 8. Ikehara, Y.; Shimizu, N.; Kono, M.; Nishihara, S.; Nakanishi, H.; Kitamura, T.; Narimatsu, H.; Tsuji, S.;
459 Tatematsu, M. A novel glycosyltransferase with a polyglutamine repeat; a new candidate for GD1alpha
460 synthase (ST6GalNAc V). *FEBS Lett.* **1999**, *463*, 92-96. PMID: 10601645.
- 461 9. Vandermeersch, S.; Vanbeselaere, J.; Delannoy, C.P.; Drolez, A.; Mysiorek, C.; Guérardel, Y.; Delannoy, P.;
462 Julien, S. Accumulation of GD1 α Ganglioside in MDA-MB-231 Breast Cancer Cells Expressing ST6GalNAc
463 V. *Molecules.* **2015**, *20*, 6913-6924. doi: 10.3390/molecules20046913.
- 464 10. Taki, T.; Ishikawa, D.; Ogura, M.; Nakajima, M.; Handa, S. Ganglioside GD1alpha functions in the adhesion
465 of metastatic tumor cells to endothelial cells of the target tissue. *Cancer Res.* **1997**, *57*, 1882-1888. PMID:
466 9157980.
- 467 11. Bos, P.D.; Zhang, X.H.; Nadal, C.; Shu, W.; Gomis, R.R.; Nguyen, D.X.; Minn, A.J.; van de Vijver, M.J.;
468 Gerald, W.L.; Foekens, J.A.; Massagué, J. Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain. *Nature.*
469 **2009**, *459*, 1005-1009. doi: 10.1038/nature08021.
- 470 12. Helms, H.C.; Abbott, N.J.; Burek, M.; Cecchelli, R.; Couraud, P.O.; Deli, M.A.; Förster, C.; Galla, H.J.;
471 Romero, I.A.; Shusta, E.V.; Stebbins, M.J.; Vandenhaute, E.; Weksler, B.; Brodin, B. In vitro models of the
472 blood-brain barrier: An overview of commonly used brain endothelial cell culture models and guidelines
473 for their use. *J. Cereb. Blood. Flow Metab.* **2016**, *36*, 862-890. doi: 10.1177/0271678X16630991. PMID: 26868179.
- 474 13. Cecchelli, R.; Aday, S.; Sevin, E.; Almeida, C.; Culot, M.; Dehouck, L.; Coisne, C.; Engelhardt, B.; Dehouck,
475 M.P.; Ferreira, L. A stable and reproducible human blood-brain barrier model derived from hematopoietic
476 stem cells. *PLoS One.* **2014**, *9*, e99733. doi: 10.1371/journal.pone.0099733 PMID: 24936790
- 477 14. Kuntz, M.; Candela, P.; Saint-Pol, J.; Lamartinière, Y.; Boucau, M.C.; Sevin, E.; Fenart, L.; Gosselet, F.
478 Bexarotene Promotes Cholesterol Efflux and Restricts Apical-to-Basolateral Transport of Amyloid- β
479 Peptides in an In Vitro Model of the Human Blood-Brain Barrier. *J. Alzheimers Dis.* **2015**, *48*, 849-862. doi:
480 10.3233/JAD-150469.
- 481 15. Drolez, A.; Vandenhaute, E.; Julien, S.; Gosselet, F.; Burchell, J.; Cecchelli, R.; Delannoy, P.; Dehouck, M.P.;
482 Mysiorek, C. Selection of a Relevant In Vitro Blood-Brain Barrier Model to Investigate Pro-Metastatic
483 Features of Human Breast Cancer Cell Lines. *PLoS One.* **2016**, *11*, e0151155. doi:
484 10.1371/journal.pone.0151155.
- 485 16. Vandenhaute, E.; Drolez, A.; Sevin, E.; Gosselet, F.; Mysiorek, C.; Dehouck, M.P. Adapting coculture in
486 vitro models of the blood-brain barrier for use in cancer research: maintaining an appropriate endothelial
487 monolayer for the assessment of transendothelial migration. *Lab Invest.* **2016**, *96*, 588-598. doi:
488 10.1038/labinvest.2016.35.
- 489 17. Pfaffl, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.*
490 **2001**, *29*, e45. PMID: 11328886.

- 491 18. Cazet, A.; Bobowski, M.; Rombouts, Y.; Lefebvre, J.; Steenackers, A.; Popa, I.; Guérardel, Y.; Le Bourhis, X.;
492 Tulasne, D.; Delannoy, P. The ganglioside G(D2) induces the constitutive activation of c-Met in MDA-MB-
493 231 breast cancer cells expressing the G(D3) synthase. *Glycobiology*. **2012**, *22*, 806–816. doi:
494 10.1093/glycob/cws049.
- 495 19. Witzel, I.; Oliveira-Ferrer, L.; Pantel, K.; Müller, V.; Wikman, H. Breast cancer brain metastases: biology
496 and new clinical perspectives. *Breast Cancer Res.* **2016**, *18*, 8. doi: 10.1186/s13058-015-0665-1. PMID: 26781299.
- 497 20. Bhuiyan, R.H.; Kondo, Y.; Yamaguchi, T.; Tokuda, N.; Ohkawa, Y.; Hashimoto, N.; Ohmi, Y.; Yamauchi,
498 Y.; Furukawa, K.; Okajima, T.; Furukawa, K. Expression analysis of 0-series gangliosides in human cancer
499 cell lines with monoclonal antibodies generated using knockout mice of ganglioside synthase genes.
500 *Glycobiology*. **2016**, Apr 21. pii: cww049. [Epub ahead of print]. PMID: 27102283.
- 501 21. Pedroso, D.C.; Tellechea, A.; Moura, L.; Fidalgo-Carvalho, I.; Duarte, J.; Carvalho, E.; Ferreira, L. Improved
502 survival, vascular differentiation and wound healing potential of stem cells co-cultured with endothelial
503 cells. *PLoS One* **2011**, *6*, e16114. doi: 10.1371/journal.pone.0016114.
- 504 22. Vandenhoute, E.; Dehouck, L.; Boucau, M.C.; Sevin, E.; Uzbekov, R.; Tardivel, M.; Gosselet, F.; Fenart, L.;
505 Cecchelli, R.; Dehouck, M.P. Modelling the neurovascular unit and the blood-brain barrier with the unique
506 function of pericytes. *Curr. Neurovasc. Res.* **2011**, *8*, 258–269. PMID: 22023614.
- 507 23. Coisne, C.; Dehouck, L.; Faveeuw, C.; Delplace, Y.; Miller, F.; Landry, C.; Morissette, C.; Fenart, L.;
508 Cecchelli, R.; Tremblay, P.; Dehouck, B. Mouse syngenic in vitro blood-brain barrier model: a new tool to
509 examine inflammatory events in cerebral endothelium. *Lab. Invest.* **2005**, *85*, 734–746. PMID: 15908914.
- 510 24. Dehouck M.P.; Cecchelli, R.; Richard Green, A.; Renftel, M.; Lundquist, S. In vitro blood-brain barrier
511 permeability and cerebral endothelial cell uptake of the neuroprotective nitron compound NXY-059 in
512 normoxic, hypoxic and ischemic conditions. *Brain Res.* **2002**, *955*, 229–235. PMID: 12419541.
- 513 25. Siflinger-Birnboim, A.; Cooper, J.A.; del Vecchio, P.J.; Lum, H.; Malik, A.B. Selectivity of the endothelial
514 monolayer: effects of increased permeability. *Microvasc. Res.* **1988**, *36*, 216–227. PMID: 3231121.
- 515 26. Schnaar, R.L. Isolation of glycosphingolipids. *Methods Enzymol.* **1994**, *230*, 348–370. PMID: 8139508.
- 516 27. Ciucanu, I.; Kerek, F. Rapid and simultaneous methylation of fatty and hydroxy fatty acids for gas-liquid
517 chromatographic analysis. *J. Chromatogr. A.* **1984**, *284*, 179–185.



© 2016 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC-BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).