

UNIVERSITE DE LILLE-FACULTE DES SCIENCES

Thèse de doctorat

Présentée par

Maxence NOEL

En vue de l'obtention du titre de

Docteur de l'Université de Lille

Discipline : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Spécialité : Biochimie et biologie moléculaire

**Etude des relations structure-fonction des
sialyltransférases humaines :
développement de nouveaux outils**

Soutenue le 07/12/2018 devant la commission d'examen :

Président : Pr. Fabrice Allain (Université de Lille)

Rapporteurs : Dr. Sylvie Fournel-Gigleux (Université de Nancy)
Pr. Muriel Bardor (Université de Rouen)

Examineurs : Pr. Abderrahman Maftah (Université de Limoges)
Dr. François Foulquier (Université de Lille)
Dr. Anne Harduin-Lepers (Université de Lille)

Ce travail a été réalisé sous la direction du Dr. Anne Harduin-Lepers
au sein de l'unité de Glycobiologie structurale et fonctionnelle (UGSF,
UMR CNRS 8576, Université de Lille)

Il a bénéficié d'une allocation de recherche du Ministère de
l'enseignement supérieur et de la recherche

Remerciements

En tout premier lieu, j'aimerais remercier la personne qui m'a le plus appris durant ces 4 années, ma tutrice Anne Harduin-Lepers. Je pense minimiser ma pensée en disant que j'ai été très chanceux de l'avoir comme directrice de thèse. Elle possède toutes les qualités qu'un étudiant puisse rechercher pour apprendre. C'est à dire la patience, une culture scientifique impressionnante, une pédagogie exemplaire et un « savoir vivre ensemble » qui nous permettent de nous épanouir en toute confiance. J'aime à penser qu'elle laissera une trace indélébile sur ma façon d'appréhender les expériences ou d'écrire des manuscrits tout au long de ma carrière. Merci, Anne, d'avoir rendu ma thèse si agréable à réaliser et merci de m'avoir tant appris. J'espère vous faire honneur à l'avenir pour vous rendre ce que vous m'avez donné.

J'aimerais adresser une pensée très chaleureuse à François Foulquier. Mon tuteur de stage de licence 3 et personne que j'estime au plus haut point. C'est lui qui m'a transmis l'amour de la glycobiologie et qui m'a mis en contact avec Anne pour réaliser mon stage de Master2. Je n'oublierai jamais que, si j'en suis arrivé là, c'est parce que tu m'as aidé. Et je suis content d'avoir retrouvé cette aide tout au long de ma thèse. Tu fais partie des personnes qu'on apprécie avoir comme ami.

Je remercie également tous les membres de mon jury de thèse. Notamment mes rapportrices, le Dr. Sylvie Fournel-Gigleux et le Pr. Muriel Bardor qui ont pris le temps de lire ce manuscrit et de l'évaluer, ainsi que de m'honorer d'une discussion scientifique et de me prodiguer quelques conseils au moment de la soutenance. Un grand merci au président de ce jury de thèse, le Pr. Allain, qui m'a apporté une aide précieuse quand je m'étais au point le test sur plaque, sa passion et ses connaissances m'ont permis d'outrepasser les problèmes que j'ai rencontré. Merci également à mes rapporteurs, le Dr. François Foulquier, à qui j'espère pouvoir répondre aux questions contrairement au moment où j'ai présenté lors du séminaire de l'Unité. J'ai également une pensée particulière au Pr. Maftah qui a toujours été présent lors des événements importants de ma thèse, c'est-à-dire du concours du grand jury, où il était mon rapporteur, jusqu'à la thèse en passant par les comités de suivi individuelles. Et enfin un grand merci à ma tutrice qui a toujours été là pour m'aider à m'améliorer, j'espère que ce manuscrit et mon oral seront à la hauteur de l'aide qu'elle m'a apporté.

Un grand merci à l'ensemble des membres de l'équipe qui ont grandement contribué à la bonne ambiance générale, à me conseiller et m'ont si bien accepté dès mon arrivée. Tout d'abord, le Pr. Philippe Delannoy qui m'a apporté énormément de conseils, je le remercie de m'avoir transmis des connaissances sur la glycobiologie. Un grand merci à Sophie, ses conseils ont toujours été

appropriés et elle a toujours été là lorsque j'ai eu besoin d'aide, je ne l'oublierai jamais. Je n'oublierai également jamais que mon premier TP, je l'ai fait avec toi, tu as su me mettre en confiance et me transmettre ta passion de l'enseignement. Merci à Virginie et à tout ton enseignement, notamment concernant la biologie moléculaire. Tu es, pour moi, la maitresse incontestable de cette discipline, je cherche toujours à comprendre comment tu fais pour réussir un clonage du premier coup. Et même au-delà de tes connaissances, tu es une personne extrêmement généreuse qui n'hésite pas à faire passer les autres avant soi, c'était vraiment un plaisir de me retrouver dans la même équipe que toi. Un grand merci à Dorothée qui m'a transmis sa rigueur au niveau du travail, tu m'as appris les secrets du Western-blot et de la culture cellulaire, probablement des techniques que je vais retrouver tout au long de ma carrière. Sache que j'aurais toujours une pensée pour toi quand je les réaliserai. Merci à Anne-Marie qui m'a appris à utiliser la radioactivité, sa passion dévorante a toujours un exemple pour moi et merci à Céline, maintenant maman, qui m'a sauvé mes chaussures, je repense toujours à ce moment quand je les mets, j'aurai du mal à jeter cette paire, et évidemment merci pour tout le reste, les moments où l'on a collaboré resteront gravés dans ma mémoire. Et enfin, merci à Justine, les délires qu'on a vécus ensemble resteront gravés dans ma mémoire, ta rigueur a toujours été exemplaire pour moi. Merci à Sumeyye d'avoir rendu ma thèse si agréable, tu fais partie des personnes qui nous aident à nous rendre compte de la chance qu'on a. De plus, jamais je n'oublierai l'anniversaire surprise que vous m'avez organisé, tes talents d'acteur se sont révélés ce jour-là Sumeyye. Et merci au dernier venu, Mathieu, très mature et toujours motivé, qui va pouvoir continuer ces travaux. On a eu énormément de délires ensemble tous les 4, travailler c'est bien mais se détendre de temps en temps ça contribue à bien travailler. On était bien soudé et on a su se remonter le moral les uns les autres. J'espère qu'on ne fera pas mentir notre adage "friendship can end, girlfriend/ boyfriend can end, only lab partner has no end". De façon générale, cette équipe m'a beaucoup apporté, entre aide au niveau théorique, aide au niveau pratique, bonne humeur générale et passion de la science. Voilà la recette pour apprécier faire une thèse car ce n'est pas que des manip, c'est une aventure humaine et une formation pour débiter une carrière dans la recherche.

De plus, non seulement l'équipe d'accueil m'a beaucoup appris mais l'Unité en elle-même a beaucoup contribué à l'aboutissement de cette thèse. Et je ne serai pas le premier, et sûrement pas le dernier, à dire que l'UGSF est une unité où il fait bon travailler. Dans ce cadre, je tiens à remercier vivement l'équipe de Yann Guérardel avec qui nous avons beaucoup collaboré, je pense n'avoir jamais vu une équipe aussi productive autour d'un verre de bière car beaucoup de bonnes idées sont nées de la chopine. Tout d'abord, il me faut remercier Yann qui, malgré son emploi du temps à faire pâlir un ministre, a toujours trouvé quelques instants pour me montrer des manip importantes dans le cadre de mon projet et à me donner des conseils qui se sont toujours révélés judicieux. Un grand

merci à Christophe Biot et Cédric Lion, je pense n'avoir connu personne avec autant de culture en chimie, merci pour vos conseils, je suis certain que sans vous, cette thèse n'aurait pas été la même. J'ai une pensée particulière à mon mentor, PA, tu as toujours trouvé quelques minutes pour mes questions stupides. Tu m'as énormément appris et je pense qu'une des choses qui me marquera le plus c'est que tu m'as transmis ta passion de la chimie, et crois-moi ce n'était pas gagné. Tu es pour moi bien plus qu'un collègue, tu es un exemple et un ami, un ami avec qui j'espère ne pas perdre contact et je te souhaite bonne chance pour la suite de ta carrière. Ces personnes citées sont un parfait exemple du fait que, si l'on veut avancer sur un projet, il faut s'ouvrir à d'autres domaines pour comprendre un sujet et le faire avancer. Merci pour tout, j'espère collaborer encore avec vous.

D'autres membres de l'équipe de Yann ont également participé à la réussite de certaines manip et à mon plaisir de me retrouver au 2^{ème} étage, et je tiens à nommer tout le monde. Merci à Nao qui m'a montré comment fonctionnait la spectrométrie de masse et qui a toujours trouvé du temps pour moi et merci à Bernadette, la bonne humeur permanente du 2^{ème} étage et un exemple de générosité qui m'a appris à utiliser l'HPLC, merci pour vos enseignements. Merci à Isabelle, ma partenaire préférée de TP, j'en aurai passé des bons moments avec toi, merci à Elisabeth pour ses conseils sur la cytométrie de flux. Merci ensuite à Christophe Mariller, Florence, Manu, Fred Krzewinsky et Fred Chirat pour leurs enseignements et leur bon accueil au 2^{ème} étage. Merci à Clément, Faustine, Clémence, Alexandre, Shin-Yi, Lin et Clément pour leur amitié que j'espère ne pas perdre.

En parlant d'équipe qui m'a beaucoup apporté, je ne pourrai pas oublier les membres de l'équipe de François Foulquier. Notamment Marie-Ange et ses conseils avisés sur les sialyltransférases et acides sialiques, tu as participé à élargir mon esprit et mes connaissances. Merci à Sandrine, Dounia, Dominique, Jean-Claude et Willy pour leur gentillesse et leur bonne humeur et surtout merci à Elodie, Marine, Anne-Sophie, Sven et Eudoxie qui ont grandement participé à la bonne ambiance du rez-de-chaussée.

Je tiens à remercier les membres de l'équipe de Fabrice Allain et notamment Agnès qui m'a montré qu'un cytomètre au bord de l'agonie pouvait encore servir. Merci à Mathieu pour ces conseils avisés sur l'activité enzymatique et un grand merci à mon poto Charles « Iron Fist » pour m'avoir fait découvrir la savate, je ne pensais pas m'attacher autant à ce sport, et merci pour tous les délires, les musiques écoutées, les bières partagées, etc. Encore quelqu'un avec qui j'espère ne pas perdre contact.

Merci au directeur de l'Unité de m'avoir accepté. Merci aux autres membres de l'Unité, Tony, Patricia et leurs équipes respectives ainsi que toutes les équipes. L'ambiance et l'entraide au C9 sont

des forces qu'il convient de conserver. J'ai une pensée également pour le personnel administratif et d'entretien, notamment Nadège et Laurence qui ont toujours été là pour aider malgré ma phobie administrative.

Merci aux plateformes Pagés et BiCell pour leurs aides techniques, je pense notamment au Dr. Slomianny, qui m'a également promulgué de précieux conseils lors de mes CSI, et à Elodie.

Et enfin, je voudrais remercier les étudiants passés au labo devenus maintenant amis, notamment Manel et Martin. Je vous souhaite la réussite dans toutes vos entreprises.

Les personnes éloignées du sujet qui liront plus que les remerciements parce que j'ai quand même passé 0,3 % de ma vie à l'écrire et 3,75 % de ma vie à la faire. Et comme le disait M. Aznavour, je remercie toutes les personnes qui n'ont pas cru en moi.

D'un point de vue plus personnel, j'aimerais remercier ma famille et notamment mes parents qui m'ont toujours soutenu et aidé dans mes entreprises. Vous m'avez laissé m'épanouir et me donner le goût de la vie et de la nature, ça n'a pu qu'influencer mes décisions dans la vie. La personne que l'on est a forcément été influencée par les parents que l'on a eus. Je pense avoir eu de bons parents et m'estime chanceux d'être votre fils. Vous allez maintenant pouvoir argumenter sur votre question préférée à présent « Que font vos enfants dans la vie ? ». Un grand merci à ma petite sœur adorée qui s'est toujours montré indispensable pour mon bien-être, je te souhaite de réussir dans ta prochaine carrière. Un dernier merci à Bahia qui a toujours montré une grande joie lors de nos retrouvailles. Tu me manqueras.

Je tiens à saluer mes amis de toujours, Dédé, Grégoire, Djoul, Mélanie, Benji, Ninon, Pierrot, Katherine, PO, Eleonore et aussi Doudou. Vous retrouver est toujours un immense plaisir et prometteur d'une bonne soirée. Je vous adore. Je salue également Besta, Skander, Marie, Quentin et Romain pour tous les bons moments.

Et évidemment, je n'en serai pas là si je ne l'avais pas connu. Elle a influencé tous mes choix et embelli ma vie depuis 8 ans. Merci à toi, Leslie, d'être présente, on s'est toujours soutenu mutuellement. On a connu les meilleurs moments et les pires mais on les a tous passé côte à côte. On dit que derrière chaque homme il y a une femme mais j'espère que, au 21ème siècle, derrière chaque femme il y a un homme et j'espère être cet homme pour toi.

Résumé

La glycosylation est une modification majeure des protéines et des lipides retrouvée chez tous les êtres vivants. Chez les animaux, les glycoconjugués jouent un rôle majeur dans les processus cellulaires et moléculaires, et en particulier dans les interactions cellulaires. Les acides sialiques, tels que le Neu5Ac ou le Neu5Gc, sont des monosaccharides acides à neuf carbones, parmi les derniers à être transféré durant la maturation des glycanes. Leur transfert est catalysé par des sialyltransférases, un groupe de glycosyltransférases golgiennes utilisant un donneur de sucre activé sous la forme d'un CMP-acide sialique. Ces enzymes, au nombre de 20 dans les tissus humains, présentent des activités enzymatiques redondantes et ont aussi une spécificité très fine vis-à-vis du substrat accepteur. On sait depuis longtemps que leur dérégulation conduit à des profils de sialylation altérés dans les situations pathologiques comme le cancer et pourtant peu de choses sont connues encore quant à leur organisation fonctionnelle dans la cellule. Les techniques d'étude de la réaction de sialylation et des sialoglycoconjugués sont nombreuses mais présentent rarement la possibilité de suivre sélectivement les *O*- ou les *N*-glycanes. Pour aborder cette question très fondamentale, j'ai produit différentes sialyltransférases de vertébrés recombinantes et solubles et j'ai mis au point de nouvelles stratégies d'étude de ces activités enzymatiques dans des essais *in vitro* et *in vivo*. Ces différentes approches trouvent des retombées dans des domaines appliqués comme la caractérisation de l'activité enzymatique et la localisation subcellulaire d'une α 2,3-sialyltransférase humaine spécifique des *O*-glycanes (ST3GAL1) et de différentes isoformes déficientes de l'enzyme résultant de mutations génétiques impliquant des acides aminés conservés et importants. J'ai tiré parti du développement récent de nouveaux outils moléculaires tels que le CMP-SiaNAI, un dérivé d'acide sialique non naturel porteur d'un groupement *N*-alcyne servant de rapporteur chimique pour la détection et la visualisation des sialoglycoconjugués par sialylation exogène et chimie click. J'ai montré que CMP-Neu5Ac et CMP-SiaNAI étaient utilisés de la même façon par ST3GAL1 et par une α 2,6-sialyltransférase spécifique des *N*-glycanes (ST6GAL1). En outre, j'ai pu apporter des éléments de compréhension quant à l'évolution moléculaire et fonctionnelle de cette ST6GAL1 chez les vertébrés, impliquant une évolution de son activité enzymatique (néofonctionnalisation) chez les mammifères. Basé sur l'utilisation du CMP-SiaNAI et des deux sialyltransférases humaines ST6GAL1 et ST3GAL1, j'ai mis au point un essai enzymatique sur plaque innovant permettant une détection rapide et sensible de ces activités enzymatiques sur une glycoprotéine désialylée. Cet essai sur plaque est maintenant étendu à d'autres sialyltransférases telles que des α 2,8-sialyltransférases (ST8SIA) ou utilisant d'autres substrats.

Mots-clés : Sialylation, sialyltransférases, chimie bioorthogonale, phylogénie, sialylation exogène, glycobiologie, CMP-acide sialique modifié.

Summary

Glycosylation is a major modification of the proteins and lipids of all living beings. In animals, glycoconjugates play a major role in cellular and molecular processes, and in particular in cellular interactions. Sialic acids, such as Neu5Ac or Neu5Gc, are nine-carbon acid monosaccharides, among the last to be transferred during glycan maturation. Their transfer is catalyzed by sialyltransferases, a subset of Golgi- glycosyltransferases using a CMP-sialic acid, an activated sugar donor. Twenty enzymes have been described in human tissues, which have redundant enzymatic activities and also have a very fine specificity towards their acceptor substrate. It has long been known that deregulation of their activity leads to altered sialylation profiles in pathological situations such as cancer, yet little is known about their functional organization in the cell. Techniques for studying the sialylation reaction and sialoglycoconjugates are numerous, but rarely present the possibility of selectively monitoring *O*- or *N*-glycans. To address this very fundamental question, I have produced different recombinant and soluble sialyltransferases of vertebrates and developed new strategies for studying these enzymatic activities in *in vitro* and *in vivo* assays. These different approaches have implications in applied fields such as the characterization of enzymatic activity and the subcellular localization of a human *O*-glycan-specific α 2,3-sialyltransferase (ST3GAL1) and different deficient enzyme isoforms resulting from genetic mutations of conserved and important amino acids. I took advantage of the recent development of new molecular tools such as CMP-SiaNAI, a non-natural sialic acid derivative with an *N*-alkyne group used as a chemical reporter for the detection and visualization of sialoglycoconjugates by exogenous sialylation and click chemistry. I have shown that CMP-Neu5Ac and CMP-SiaNAI are used with the same affinity by ST3GAL1 and by a *N*-glycan-specific α 2,6-sialyltransferase (ST6GAL1). In addition, I was able to provide insights into the molecular and functional evolution of this ST6GAL1 in vertebrates, which evolved a new enzymatic specificity in mammals (neofunctionalization). Based on the use of CMP-SiaNAI and the two human sialyltransferases ST6GAL1 and ST3GAL1, I have developed an innovative plate enzyme assay for the rapid and sensitive detection of these enzyme activities on desialylated glycoproteins. This plate assay is now being extended to other sialyltransferases such as α ,8-sialyltransferases (ST8SIA) or using other substrates.

Keywords : Sialylation, sialyltransferases, bioorthogonal chemistry, phylogeny, exogenous sialylation, glycobiologie, modified CMP-sialic acid.

Abréviations

- Asn : Asparagine
- Asp : Acide aspartique
- ACE : Antigène carcino-embryonnaire
- ADCC : Antibody dependent cellular toxicity
- ADN : Acide désoxyribonucléique
- ADP : Adénosine diphosphate
- aHUS : Atypical hemolytic uremic syndrome
- Ala : Alanine
- AMP : Adénosine monophosphate
- ARN/ RNA : Acide ribonucléique/ Ribonucleic acid
- ARNm : ARN messenger
- ATP : Adénosine triphosphate
- BACE : β -site amyloid precursor protein cleaving enzyme
- BCR : B cell receptor
- BCV : Coronavirus bovin
- BSA : Bovine serum albumine
- B3GNT : UDP-GlcNAc: BetaGal beta-1,3-*N*-acetylglucosaminyltransférase
- B4GALT : Beta-1,4-galactosyltransférase
- CASD1 : N-acetylneuraminase 9-*O*-acetyltransferase
- CAZy : Carbohydrate active enzyme
- CD : Cluster de différenciation
- CDG : Congenital disorders of glycosylation
- CEGL : Chemoenzymatic glycan labeling
- Cer : Céramide
- CHO : Chinese hamster ovary
- CHST : Carbohydrate sulfotransferase
- CMAS : CMP-sialic acid synthetase
- CMAH : CMP-acide sialique hydroxylase
- CMAHase : CMP-acide sialique hydrolase
- CMP : Cytidine monophosphate
- CoA : Coenzyme A
- COG : Conserved oligomeric golgi
- COLGALT : collagen beta (1-*O*)galactosyltransferase
- CTP : Cytidine triphosphate
- CuAAC : Copper catalyzed azide alkyne cycloaddition
- Cys : Cystéine
- DIFO : Difluorooctyne
- DMB : 1,2-diamino-4,5-methylenedioxybenzene
- DO : Densité optique
- DPAGT : UDP-*N*-acetylglucosamine-dolichyl phosphate *N*-acetyl glucosamine phosphatransferase
- EDEM : ER-degradation enhancing α -mannosidase like protein
- EDTA : Ethylénediaminetétraacétique
- EGF : Epidermal growth factor

- EGFR : EGF receptor
- ERAD : ER-associated degradation pathway
- DPEase : D-psicose 3-epimerase
- FGFR : Fibroblast growth factor receptor
- FITC: Isothiocyanate de fluorescéine
- FRET : Fluorescence resonance energy transfer
- FUT : Fucosyltransferase
- GAG : Glycosaminoglycane
- Gal : Galactose
- GalA : Acide galacturonique
- GalNAc : *N*-acetylgalactosamine
- GALNT : polypeptide *N*-acetylgalactosaminyltransferase
- GANAB : Neutral alpha-glucosidase AB
- GAP : GTPase activating protein
- GDF : GDP displacement factor
- GDI : GDP dissociation factor
- GDP : Guanosine diphosphate
- GDR : Groupe de recherche
- GEF : GDP/ GTP exchange factor
- Glc : Glucose
- GlcA : Acide glucuronique
- GlcNAc : *N*-acetylglucosamine
- Gly : Glycine
- GMP : Guanosine monophosphate
- GNE : UDP-*N*-acetylglucosamine 2-epimerase/ *N*-acetylmannosamine kinase
- HEK : Human embryonic kidney
- HRP : Horseradish peroxidase
- HUGO : Human gene organization
- IdoA : Acide iduronique
- IP : Immunoprecipitation
- kDa : Kilodalton
- Kdn : Acide ketodeoxynononique
- Kdo : Acide ketodeoxyoctonique
- LC/ MS : Liquid chromatography/ mass spectrometry
- LECA : Last eukaryotic common ancestor
- Leu: Leucine
- MAL : *Maackia amurensis* lectin
- Man : Mannose
- ManA : Acide mannuronique
- ManNAc : *N*-acetylmannosamine
- ManNAI : *N*-alkynemannosamine
- MAN1A : Alpha mannosidase class 1A
- MAN2A : Alpha-mannosidase class 2A
- mM : Millimolaire
- MGAT : Alpha-1,3-mannosyl-glycoprotein2-beta-*N*-acetylglucosaminyltransferase

- Min : Minute
- miRNA : micro-ARN
- MLV : Murine leukemia virus
- mM : Millimolaire
- MPSA : Microplate sialyltransferase assay
- NAGT : *N*-acetylglucosaminyltransferase
- NANP : *N*-acetylneuraminic acid phosphatase
- NANS : *N*-acetylneuraminic acid synthase
- NCAM : Neural cell adhesion molecule
- Ng : Nanogramme
- NET : Neutrophil extracellular trap
- Neu : Neuraminidase
- Neu5Ac : *N*-acetylneuraminic acid
- Neu5Gc : *N*-glycolylneuraminic acid
- NDP : Nucleotide diphosphate
- Nm : Nanomètre
- OCAM : Olfactory cell adhesion molecule
- OGA : *O*-GlcNAcase
- OGT : *O*-GlcNAc transferase
- OST : Oligosaccharidyltransferase
- PCR : Polymerase chain reaction
- PDB : Protein data bank
- PEG : Polyéthylène glycol
- PGM : Porcine gastric mucine
- pH : Potentiel hydrogène
- Pi : Phosphate inorganique
- PNGase : Peptide : *N*-glycosidase
- POFUT : Protein *O*-fucosyltransferase
- POGLUT : Protein *O*-glucosyltransferase
- POMT : Protein *O*-mannosyltransferase
- QI : Quotient Intellectuel
- RE : Réticulum endoplasmique
- RFT : Riboflavin transporter
- RIPA : Radioimmunoprecipitation assay
- RMN : Résonance magnétique nucléaire
- RPM : Rotation par minute
- SAR : Stramenopiles, rhizaria, alveolata
- SDP : Specificity determining position
- SDS-PAGE : Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
- SEEL : Selective exo-enzymatic ligation
- Ser : Sérine
- SiaNAI : *N*-alkyne sialic acid
- SIGLEC : Sialic acid-binding immunoglobulin-type lectin
- siRNA : Silencing RNA
- sLe^x : Sialyl lewis x

- SNA : *Sambucus nigra* agglutinin
- SNARE : Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor
- SPAAC : Strain promoted azide alkyne cycloaddition
- STT3A : Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase
- ST3GAL : Beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase
- ST6GAL : Beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase
- ST6GALNAC : *N*-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase
- ST8SIA : Alpha-*N*-acetyl neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase
- TGF : Transforming growth factor
- Thr : Thréonine
- TLR : Toll-like receptor
- TMB : 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine
- TMEM : Transmembrane protein
- TSR : Thrombospondin repeat
- UDP : Uridine diphosphate
- UGGT : UDP-glucose : glycoprotein glucosyltransferase
- UGT : UDP-glucuronosyltransferase
- UMP : Uridine monophosphate
- UTR : Untranslated region
- WGD : Whole genome duplication
- XYLT : Xylosyltransferase
- µg : Microgramme
- µL : Microlitre
- µM : Micromolaire

Publications

Articles scientifiques:

- Gilormini PA, Lion C, **Noel M**, Krzewinski-Recchi MA, Harduin-Lepers A, Guérardel Y, Biot C. Improved workflow for the efficient preparation of ready to use CMP-activated sialic acids. *Glycobiology*. 2016 Nov;26(11):1151-1156.
- **Noel M**, Gilormini PA, Cogez V, Yamakawa N, Vicogne D, Lion C, Biot C, Guérardel Y, Harduin-Lepers A. Probing the CMP-Sialic Acid Donor Specificity of Two Human β -d-Galactoside Sialyltransferases (ST3Gal I and ST6Gal I) Selectively Acting on O- and N-Glycosylproteins. *Chembiochem*. 2017 Jul 4;18(13):1251-1259.
- Dewald JH, Cavdarli S, Steenackers A, Delannoy CP, Mortuaire M, Spriet C, **Noël M**, Groux-Degroote S, Delannoy P. TNF differentially regulates ganglioside biosynthesis and expression in breast cancer cell lines. *PLoS One*. 2018 Apr 26;13(4).
- Groux-Degroote S, Schulz C, Cogez V, **Noël M**, Portier L, Vicogne D, Solorzano C, Dall'Olio F, Steenackers A, Mortuaire M, Gonzalez-Pisfil M, Henry M, Foulquier F, Héliot L, Harduin-Lepers A. The extended cytoplasmic tail of the human B4GALNT2 is critical for its Golgi targeting and post-Golgi sorting. *FEBS J*. 2018 Sept;285(18).
- **Noel M**, Gilormini PA, Cogez V, Lion C, Biot C, Harduin-Lepers A, Guérardel Y. MicroPlate Sialyltransferase Assay: A Rapid and Sensitive Assay Based on an Unnatural Sialic Acid Donor and Bioorthogonal Chemistry. *Bioconjug Chem*. 2018 Oct 17 ;29(10).

Communications orales :

- Study of the structure-function relationships of glycosyltransferases: insights into sialyltransferases activity towards unnatural substrates.

M. Noel; P.A. Gilormini.; V. Cogez.; N. Yamakawa.; D. Vicogne.; C. Lion.; C. Biot.; Y. Guérardel.; A. Harduin-Lepers.

28th Joint Glycobiology Meeting, Aachen, Allemagne, 17-19 Septembre 2017.

Posters :

- **Development of new tools for studying sialoglycans and their cognate biosynthetic enzymes.**
M. Noel; P.A. Gilormini.; M. Decloquement.; V. Cogez.; N. Yamakawa.; D. Vicogne.; C. Lion.; C. Biot.; Y. Guérardel.; A. Harduin-Lepers.
- International Sialoglyco Meeting, Banff, Canada, 10-14 Mai 2018.

- **Glycosyltransferases engineering for glycoconjugates analysis and bioimaging in living cells**
Maxence Noel, Virginie Cogez, Dorothée Vicogne and Anne Harduin-Lepers
 Journée André Verbert, Lille, France, 14 Septembre 2017

- **Glycosyltransferases engineering for glycoconjugates analysis and bioimaging in living cells**
Maxence Noel, Virginie Cogez, Anne-Marie Mir, Dorothée Vicogne and Anne Harduin-Lepers
 Mifobio 2017, Aussois, France, 30 septembre – 7 octobre 2017

- **³¹P NMR applied to the production of activated sialic acids: *In situ* live monitoring of an enzymatic process.**
Gilormini, P.A.; Lion, C.; **Noel M.**; Krzewinski-Recchi M.A.; Harduin-Lepers, A.; Guérardel, Y.; Biot, C.
 19th European Carbohydrate Symposium (Eurocarb), Barcelona, Spain, 2-7 Juillet 2017.

- **³¹P NMR snapshots to improve the chemoenzymatic synthesis of activated sialic acids.**
Gilormini, P.A.; Biot, C.; **Noel M.**; Krzewinski-Recchi M.A.; Harduin-Lepers, A.; Guérardel, Y.; Lion, C.
 Frontiers in Sialic Acid Research Conference – From Structural Diversity to Functional Glycobiology,
 Bad Lauterberg, Germany, 23 – 25 Avril 2016.

- **Glycosyltransferases engineering for glycoconjugates analysis and bioimaging in living cells**
Maxence Noel, Virginie Cogez, Anne-Marie Mir, Dorothée Vicogne and Anne Harduin-Lepers
 26th Joint Glycobiology Meeting, Lille, France, 25 – 27 octobre 2015

- **Glycosyltransferases engineering for glycoconjugates analysis and bioimaging in living cells**
Maxence Noel, Virginie Cogez, Anne-Marie Mir, Dorothée Vicogne et Anne Harduin-Lepers
 GDR Biosynsys, Paris, France, 7-10 Septembre 2015

Table des matières

Remerciements	4
Résumé	8
Summary	9
Abréviations	11
Publications	15
Table des matières	17
Index des figures et tableaux	20
Avant-propos	26
INTRODUCTION	
I. Les monosaccharides et leurs voies de biosynthèse.....	29
A. Les monosaccharides et les liaisons glycosidiques.....	29
B. Les acides sialiques.....	31
II. La machinerie de glycosylation	34
A. Les glycosyl-nucléotides.....	34
B. Les transporteurs des glycosyl-nucléotides.....	36
C. Les glycosyltransférases.....	37
III. Biosynthèse des glycoconjugués sialylés.....	41
A. Métabolisme de l'acide sialique.....	41
B. La biosynthèse des glycoconjugués sialylés.....	45
1. Biosynthèse des <i>N</i> -glycannes.....	45
2. Biosynthèse des <i>O</i> -glycannes.....	49
3. Biosynthèse des gangliosides.....	52
IV. Les sialyltransférases	55
A. Les gènes de sialyltransférases.....	56
B. Régulation transcriptionnelle.....	59
C. Régulation de l'expression des gènes de sialyltransférase par épigénétique.....	60
D. Régulation post-transcriptionnelle par les miRNAs (micro-ARNs).....	60
E. Structure des sialyltransférases.....	61
F. Les modifications post-traductionnelles des sialyltransférases.....	68
G. Interactions avec d'autres glycosyltransférases.....	69
H. Localisation des sialyltransférases.....	71
1. Dans la cellule.....	71
2. Dans les tissus.....	71

I.	Spécificités enzymatiques des sialyltransférases	72
J.	Mécanismes moléculaires de la réaction de sialylation.....	75
K.	Evolution moléculaire des sialyltransférases	77
V.	Importance des sialyltransférases et sialoglycoconjugués.....	82
A.	Les cancers	82
B.	Les Congenital Disorders of Glycosylation.....	84
C.	Implication dans les fonctions neuronales et pathologies associés	85
D.	Modulation de la réponse immunitaire et maladies autoimmunes.....	86
E.	L'acide sialique dans les fluides corporels : implication dans la demi-vie des glycoconjugués et le développement des capacités cognitives chez le nourrisson.....	89
F.	Utilisation des acides sialiques et détournement de ces avantages par les virus, bactéries et parasites.....	90
G.	Pathologies liées aux acides sialiques.....	91
VI.	Les différentes techniques d'étude.....	91
A.	Les lectines.....	91
B.	Les anticorps	92
C.	Les acides sialiques modifiés.....	92
1.	Les rapporteurs chimiques.....	92
2.	Les inhibiteurs des sialyltransférases.....	97
3.	Etude de l'activité des sialyltransférases.....	98
D.	L'utilisation de substrats radiomarqués	99
E.	Les tests colorimétriques	100

RESULTATS

I.	Utilisation de ST6GAL1 et ST3GAL1 pour le développement de nouveaux outils d'étude des sialyltransférases	104
A.	Constructions moléculaires pour la production des enzymes recombinantes : $\Delta 56$ ST3GAL1 et $\Delta 56$ ST6GAL1.....	104
II.	Etude de l'implication d'un acide aminé conservé au cours de l'évolution sur les propriétés de ST3GAL1.	114
III.	Synthèse d'un acide sialique non naturel : le CMP-SiaNAI, utilisation par les sialyltransférases et applications	121
A.	Synthèse du CMP-SiaNAI	121
B.	Utilisation du CMP-SiaNAI par ST3GAL1 et ST6GAL1	124
1.	<i>In vitro</i>	124
2.	<i>In cellulo</i>	128
C.	Utilisation du CMP-SiaNAI déjà clické par ST3GAL1 et ST6GAL1	131

IV. Utilisation et développement d'un outil simple permettant d'étudier les caractéristiques biochimiques des sialyltransférases : le MPSA (Microplate Sialyltransferase Assay)	134
A. Preuve de concept du test enzymatique sur plaque avec $\Delta 56ST6GAL1$	135
B. Optimisation du test enzymatique sur plaque avec $\Delta 56ST6GAL1$ et $\Delta 56ST3GAL1$	136
C. Utilisation du test enzymatique sur plaque MPSA pour déterminer l'effet des cations sur l'activité de $\Delta 56ST6GAL1$ et $\Delta 56ST3GAL1$	140
V. Application du test MPSA à la caractérisation enzymatique d'enzymes de poisson-zèbre .	145

DISCUSSION

I. Développement d'outils pour l'étude des sialyltransférases	157
II. Développement d'un test innovant : le MPSA.....	161
III. Implication des cations dans l'activité enzymatique	162
IV. Evolution moléculaire des ST6GAL et ST8SIA au cours de l'évolution	165
V. Amélioration des prédictions bio-informatiques.....	168
Participation collaborative.....	171
A. Au sein de l'équipe : Etude de la localisation d'une isoforme de la $\beta 4GALNACT2$	171
B. Au sein de l'unité : Etude de l'activité des sialyltransférases par RMN (Résonance Magnétique Nucléaire).....	173
C. A l'international : Effet du potentiel oxydatif sur l'oligomérisation de ST6GAL1 et son activité.	174
D. A l'international : Etude de l'effet inhibiteur de certaines molécules sur ST6GAL1 et ST3GAL1	175

MATERIELS & METHODES

I. Construction des plasmides permettant l'expression de sialyltransférases recombinantes.....	178
II. Culture cellulaire.....	181
III. Synthèse du CMP-SiaNAI	181
IV. Réaction de sialylation en utilisant du CMP- $[^{14}C]$ Neu5Ac	181
V. Quantification du SiaNAI transféré par analyse en micro-LC/ESI-MRM-MS ₃	182
VI. SDS-PAGE et analyse en Western-blot	183
VII. Sialylation exogène	184

Index des figures et tableaux

Figure 1. Représentation du glucose et du galactose.....	28
Figure 2. Représentation des différents monosaccharides.....	29
Figure 3. Liaison <i>N</i> -osidique et <i>O</i> -osidique d'un monosaccharide sur une protéine.....	30
Figure 4. Représentation des principaux acides sialiques retrouvés chez les mammifères.....	32
Figure 5. Biosynthèse et voie de conversion des différents monosaccharides.....	33
Figure 6. Réactions permettant la synthèse de glycosyl-nucléotides.....	34
Figure 7. Schéma des transporteurs connus pour les glycosyl-nucléotides.....	35
Figure 8. Représentation de la conformation des enzymes de type GT-A et GT-B.....	36
Figure 9. Schéma explicatif du cycle d'association et dissociation des protéines Rab.....	38
Figure 10. Schéma illustrant l'interaction des complexes COG avec les facteurs impliqués dans le trafic vésiculaire.....	39
Figure 11. Trafic de l'acide sialique chez les vertébrés.....	42
Figure 12. Implication d'un cation divalent (Me^{2+}) dans la stabilisation de la liaison entre l'acide sialique et le CMP.....	43
Figure 13. Réactions de synthèse des <i>N</i> -glycannes dans le RE chez une cellule eucaryote (<i>S. cerevisiae</i>).....	45
Figure 14. Les 3 grandes classes de glycanne.....	46
Figure 15. Maturation des <i>N</i> -glycannes au sein de l'appareil de Golgi.....	48
Figure 16. Séquence des différents noyaux retrouvés chez les <i>O</i> -glycannes de type mucine.....	49
Figure 17. Exemple de <i>O</i> -glycanne de type protéoglycane.....	50
Figure 18. Schéma du <i>O</i> -mannosyl glycanne de l' α -dystroglycane du muscle squelettique.....	51
Figure 19. Schéma de glycanne <i>O</i> -fucosylé (en haut) et <i>O</i> -glucosylé (en bas) présent sur les domaines EGF de la protéine NOTCH.....	51
Figure 20. Voie de biosynthèse des gangliosides.....	53
Figure 21. Schéma de la réaction de sialylation.....	54
Figure 22. Schéma montrant l'organisation génique des gènes humains de sialyltransférases.....	57

Figure 23. Représentation des différents domaines des sialyltransférases.....	61
Figure 24. Figures illustrant 2 niveaux de conservation des acides aminés.....	62
Figure 25. Effets de mutations dans les sialylmotifs et les motifs de famille sur la ST6GAL1 humaine.....	64
Figure 26. Effets de mutations dans les sialylmotifs de la ST3GAL1 humaine.....	65
Figure 27. Données cristallographiques de la ST6GAL1 et ST6GAL2 humaine avec mise en évidence du SDP en position 122 et son importance dans la reconnaissance du monosaccharide accepteur.....	66
Figure 28. Implications des cystéines dans les propriétés enzymatiques de ST6GAL1 de rat.....	69
Figure 29 : CMP-acide sialique et acide sialique avec l'ion oxocarbonium séparé du CMP.....	74
Figure 30 : Mécanisme de réaction de la sialylation et interaction avec les acides aminés de ST3GAL1 de porc (<i>Sus scrofa</i>).....	75
Figure 31 : Evolution des sialyltransférases.....	77
Figure 32. Evolution des gènes de sialyltransférases après les événements de duplication complète du génome.....	78
Figure 33. Synténie conservée autour de <i>st6gal1</i> chez <i>homo sapiens</i> , <i>mus musculus</i> , <i>gallus gallus</i> et interrompue chez le poisson <i>Danio rerio</i>	79
Figure 34 : Schéma de glycoprotéines présentant les caractéristiques de différents CDG.....	83
Figure 35. Schéma de la composition de NETs (Neutrophils Extracellular Traps).....	86
Figure 36. Schéma de l'effet « Red Queen ».....	88
Figure 37. Mécanisme de la CuAAC.....	92
Figure 38. Schéma de la réaction de SPAAC.....	93
Figure 39. Expression temporelle de différents glycanes au cours du développement embryonnaire du poisson zèbre.....	94
Figure 40. Localisation des protéines sialylées par ST6GAL1.....	95
Figure 41. Représentation de la molécule composé d'acide sialique, d'héparane sulfate et de biotine.....	96
Figure 42. Représentation des différents acides sialiques utilisés pour l'inhibition de ST8SIA2.....	97
Figure 43. Principe du comptage de la radioactivité associée à la glycoprotéine sialylée.....	98

Figure 44. Principe de la réaction utilisée par le kit R&D.....	99
Figure 45. Principe de la réaction développée par Promega pour étudier l'activité des galactosyltransférases.....	100
Figure 46. Détermination de la durée optimale de transfection.....	104
Figure 47. Activité des sialyltransférases dans le milieu de culture avec différentes formes tronquées de ST3GAL1.....	105
Figure 48. Analyse de l'expression des enzymes ST6GAL1 tronquées dans les lysats cellulaires et de leur sécrétion dans le milieu de culture après 36 h de transfection.....	106
Figure 49. Activité brute et relative l'intensité du signal obtenue par Western-blot.....	106
Figure 50. Evaluation de l'efficacité d'extraction protéique de différents tampons RIPA.....	107
Figure 51. Effets de différents tampons RIPA sur l'activité enzymatique.....	108
Figure 52. Présence de la ST3GAL1 au cours des différentes étapes de l'immupréciipiation et comparaison avec ST6GAL1	109
Figure 53. Activité relative des enzymes sur billes.....	110
Figure 54. Détection de la présence de phosphate au sein de différents réactifs utilisés pour la réaction de sialylation par le kit R&D.....	111
Figure 55. Western-blot des milieux de culture des cellules transfectées.....	112
Figure 56. Western blot de $\Delta 56$ ST6GAL1 et $\Delta 56$ ST3GAL1 avec ou sans traitement à la PNGase F....	113
Figure 57. Localisation de SDP dans la structure de ST3GAL1 de co-évolution avec d'autres acides aminés.....	114
Figure 58. Western blot des formes tronquées et complètes des formes WT, mutantes G288D et G288A.....	116
Figure 59. Activité relative des différentes formes tronquées et complètes de ST3GAL1 dans les lysats cellulaires.....	117
Figure 60. Localisation sub-cellulaire des différentes formes mutantes de ST3GAL1.....	118
Figure 61. Représentation structurale de la ST3GAL1 de porc (<i>Sus scrofa</i>) avec identification de la glycine, du disaccharide accepteur et du feuillet β adjacent.....	119
Figure 62. Etapes de synthèse chimique du ManNAI.....	120
Figure 63. Etapes de synthèse du SiaNAI à partir du ManNAI.....	121
Figure 64. Synthèse du CMP-SiaNAI.....	121

Figure 65. Spectres RMN lors de la synthèse du CMP-Neu5Ac à différents moments de l'incubation.....	122
Figure 66. Sialylation de la fétuine désialylée et non désialylée avec et sans digestion par la sialidase d' <i>Arthrobacter ureafaciens</i>	123
Figure 67. Western-Blot des substrats accepteurs sialylés par le CMP-SiaNAI avec les différents milieux de culture contenant les sialyltransférases.....	124
Figure 68. Courbe de Michaelis-Menten de $\Delta 56ST6GAL1$ et $\Delta 56ST3GAL1$ vis-à-vis du CMP-Neu5Ac ou du CMP-SiaNAI.....	126
Figure 69. Activité enzymatique des 2 enzymes recombinants envers les 2 substrats donneurs.....	127
Figure 70. Activité <i>in cellulo</i> de ST6GAL1 sur les CHO-Lec2 en microscopie.....	128
Figure 71. Activité <i>in cellulo</i> de ST6GAL1 sur les CHO-Lec2 en cytométrie.....	129
Figure 72. Activité <i>in cellulo</i> de ST3GAL1 sur les CHO-Lec2.....	130
Figure 73. Représentation du CMP-SiaNAI couplé à la molécule d'azido-PEG3-biotine par CuAAC...131	
Figure 74. Activité <i>in vivo</i> de ST3GAL1 et ST6GAL1 sur les CHO-Lec2 avec le CMP-SiaNAI clické.....	132
Figure 75. Principe du test MPSA.....	134
Figure 76. Preuve de concept du MPSA.....	135
Figure 77. Détermination des paramètres cinétiques avec le MPSA.....	137
Figure 78. Préférence de glycoprotéines acceptrices pour ST6GAL1 et ST3GAL1.....	139
Figure 79. Inhibition sur l'activité de ST6GAL1 et ST3GAL1 recombinantes.....	141
Figure 80. Effet du contre-ion sur l'activité enzymatique.....	142
Figure 81. Effets de différents ions sur l'activité enzymatique de ST6GAL1 et ST3GAL1.....	143
Figure 82. Absorbance relative de ST6GAL1 en fonction de différentes concentrations en CMP-SiaNAI clické.....	144
Figure 83. Western Blot des productions de l'orthologue de ST6GAL1 humaine et de poisson-zèbre dans les cellules CHO-K1 en utilisant un anticorps anti-flag.....	146
Figure 84. Représentation du LacDiNAc MP glycoside fabriqué par la société TCI chemicals.....	146

Figure 85. Activité enzymatique de ST6GAL1 d' <i>homo sapiens</i> et <i>danio rerio</i> vis-à-vis de l'asialofétuine, de l'asialoorosomucoide et du disaccharide LacDiNAc.....	147
Figure 86. Expression et sécrétion des orthologues de ST6GAL1.....	148
Figure 87. Séquences en acides aminés des différents orthologues de ST6GAL1.....	148
Figure 88. Western-blot dirigé contre les enzymes recombinantes possédant le 3XFlag.....	149
Figure 89. Test de caractérisation enzymatique en utilisant du CMP-[¹⁴ C]Neu5Ac.....	150
Figure 90. Test de caractérisation enzymatique grâce au MPSA.....	150
Figure 91. Analyse de cytométrie en flux des lignées CHO-K1 et CHO-Lec8 sialylées de façon exogène avec les orthologues de ST6GAL1.....	151
Figure 92. Schématisation de l'évolution des gènes de la famille de ST8SIA.....	153
Figure 93. Activité de ST8SIA6 vis-à-vis de substrats porteurs de Neu5Ac ou Neu5Gc.....	154
Figure 94. Alignement de séquences protéiques de plusieurs sialyltransférases appartenant à la sous-famille des ST6GAL1.....	158
Figure 95. Tableau périodique des éléments.....	163
Figure 96. Représentation des SDP impliqués dans la reconnaissance de substrat accepteur chez les orthologues de ST6GAL1.....	166
Figure 97. Antibody uptake des cellules LS174T transfectées stablement avec la forme longue (LS174T-L21) ou courte (LS174T-S2) de la β 4GALNACT2.....	170
Figure 98. Biotinylation de surface des LS174T mock, transfectées avec la forme longue (LS174T-L21) ou courte (LS174T-S2).....	171
Figure 99. Etude de l'activité de ST6GAL1 par RMN.....	173
Figure 100. Activité des différentes formes de ST6GAL1.....	174
Figure 101. Activité des molécules synthétisées par l'équipe du Pr. Skropetta sur l'activité enzymatique de ST3GAL1 et ST6GAL1.....	175
Figure 102. Schéma des vecteurs CMV9 pour les formes tronquées et CMV10 pour les formes pleines taille de l'enzyme.....	177

Tableau 1. Propriétés générales des neuraminidases de mammifères.....	43
Tableau 2. Position des gènes dans le génome humain avec leur nombre d'exons.....	55
Tableau 3. Facteurs de transcription impliqués dans la régulation transcriptionnelle des gènes de sialyltransférases.....	58
Tableau 4. miRNAs inhibant directement ou indirectement l'expression des sialyltransférases.....	60
Tableau 5. Spécificité des sialyltransférases.....	71
Tableau 6. Affinité des sialyltransférases vis-à-vis du CMP-Neu5Ac, du CMP-SiaNAI et du CMP-SiaNAI clické.....	159
Tableau 7. Valeurs de l'activité de ST6GAL1 et ST3GAL1 avec 10 mM de manganèse.....	162
Tableau 8. Séquence des différentes amorces utilisées lors des PCRs.....	177

Avant-propos

« Ce sont parfois les personnes dont on n'attend rien qui font les choses que nul n'imagine. »

The Imitation Game.

On a coutume de diviser la biologie cellulaire en plusieurs disciplines. La discipline de la génomique qui comprend l'étude des gènes présents au sein du noyau, au niveau des chromosomes, et codé sous forme d'ADN grâce à la présence de 4 bases azotées : adénine, thymine, guanine et cytosine. L'épigénétique permet de moduler l'expression de ces gènes grâce à des modifications apportées aux histones, des protéines associées à l'ADN, mais également directement au niveau de certaines bases azotées. Si les conditions sont réunies pour l'expression du gène, il y aura synthèse d'un brin d'ARNm qui permettra de former une protéine. L'étude de ces dernières forme la discipline de la protéomique qui étudie l'implication des protéines dans les nombreuses voies métaboliques cellulaires. Ce domaine permet d'étudier les modifications post-traductionnelles de type phosphorylation, ubiquitinylation, glycosylation, *etc.* On trouve également le domaine de la lipidomique qui étudie l'implication des lipides dans la cellule. Ces lipides sont impliqués dans la formation des membranes des différents compartiments cellulaires que l'on peut trouver comme la membrane plasmique, le noyau, l'appareil de Golgi, les mitochondries, *etc.* Beaucoup des protéines sont associées à ces lipides afin de transmettre des informations à travers ces compartiments. Et enfin, le domaine de la glycomique qui se base sur l'étude des glycanes, entité complexe constituée d'hydrate de carbone. Ces molécules sont présentes dans tous les compartiments cellulaires mais, chez les eucaryotes supérieurs, on les retrouve principalement au niveau du réticulum endoplasmique (RE), de l'appareil de Golgi et de la surface cellulaire. La plupart de ces glycanes sont associés aux protéines et aux lipides. Bien que tous ces domaines soient essentiels, complémentaires et impliqués dans les mécanismes cellulaires, je vais développer ici la partie glycomique.

Au cours de ma thèse, je me suis intéressé aux dernières étapes de la biosynthèse de ces biomolécules complexes que sont les glycoconjugués et plus particulièrement à ceux porteurs d'acide sialique qui prennent place dans l'appareil de Golgi. Nous sommes encore très loin de maîtriser tous les aspects de la régulation de la machinerie cellulaire et moléculaire impliquée dans la glycosylation

ainsi que son organisation fonctionnelle. Cette problématique se justifie, en partie, par le manque d'outils dédiés. Par ailleurs, la compréhension du fonctionnement des enzymes impliqués dans la glycosylation permettra d'en trouver les mécanismes fonctionnels fondamentaux. Cette compréhension peut se faire en tenant compte de l'information génétique et évolutive *via* la comparaison des séquences d'ADN ou protéique de ces enzymes au cours de l'évolution associée à l'acquisition ou la perte de propriétés au niveau de ces enzymes. Mes travaux de thèse s'inscrivent dans cette logique. Tout d'abord nous avons procédé au développement d'outils innovants permettant d'étudier facilement ces enzymes d'un point de vue biochimique, puis nous nous sommes appuyés sur les séquences connues de ces glycosyltransférases pour en extraire des hypothèses qui ont ensuite été vérifiées grâce à l'utilisation de ces outils précédemment citées.

Ce manuscrit de thèse s'articule en 4 chapitres : une partie introductive où je détaille la machinerie de glycosylation en me focalisant sur les sialyltransférases et acides sialiques et les diverses réactions physico-chimiques auxquelles ils participent. C'est pourquoi nous aborderons les différents oses présents dans les cellules eucaryotes avec leur voie de biosynthèse et leur transport, en me focalisant sur l'acide sialique. Je poursuis en énumérant les différents acteurs importants dans le processus de glycosylation et la biosynthèse des différents glycoconjugués sialylés. J'énonce l'implication des sialyltransférases dans cette biosynthèse en mettant en lumière l'importance de la structure de l'enzyme pour sa fonction enzymatique. Je continue en parlant de l'importance des glycoconjugués sialylés dans différents processus physiopathologiques et je termine en énonçant les différents outils utilisables à l'heure actuelle pour étudier les sialyltransférases et les sialoglycoconjugués. Dans le deuxième chapitre, je développe les résultats obtenus durant mes 3 années de thèse. Je détaille les outils que nous avons développés et leurs applications sur différentes questions biologiques et leur apport dans le domaine. L'avant dernière partie discute des résultats obtenus et notamment l'apport de ces travaux au domaine de recherche. La dernière partie montre la partie technique du projet et la façon dont ces résultats ont été obtenus.

Cette thèse m'a énormément appris. D'abord parce que j'ai suivi un parcours de biologie cellulaire et donc la biochimie, la chimie, l'acide sialique et les sialyltransférases représentaient un domaine nouveau pour moi au commencement de mon master 2. Ensuite, parce que j'ai pu goûter à l'enseignement en tant que moniteur et améliorer mes capacités à transmettre un message. Dans cette idée, j'ai également pu entraîner mes capacités rédactionnelles. La thèse nous force à nous améliorer sur énormément de domaines et j'ai pris beaucoup de plaisir à recevoir cette formation.

INTRODUCTION

I. Les monosaccharides et leurs voies de biosynthèse

A. Les monosaccharides et les liaisons glycosidiques

Au même titre que l'acide aminé est le composant élémentaire d'une protéine, le monosaccharide est à la base de la formation des glycanes. Les monosaccharides, également appelés oses, sont des molécules composées d'atomes de carbone, d'hydrogène et d'oxygène d'où leur nomination de « carbohydrate » ou hydrate de carbone. La formule générale d'un monosaccharide est $C_nH_{2n}O_n$ et ceux-ci sont nommés en fonction de la longueur de leur chaîne

carbonée (qui va de 3 à 9 carbones) et également par la présence d'un groupement cétone ($\begin{matrix} R \\ \diagdown \\ C=O \\ \diagup \\ R \end{matrix}$)

ou aldéhyde ($\begin{matrix} R \\ \diagdown \\ C=O \\ \diagup \\ H \end{matrix}$) révélée une fois le monosaccharide sous forme ouverte. Par exemple, le glucose et le galactose sont des hexoses car ils possèdent 6 carbones et également des aldoses car leur forme ouverte met en évidence le groupement aldéhyde. Ils diffèrent entre eux par la position des groupements hydroxyles au niveau du plan du cycle (Figure 1).

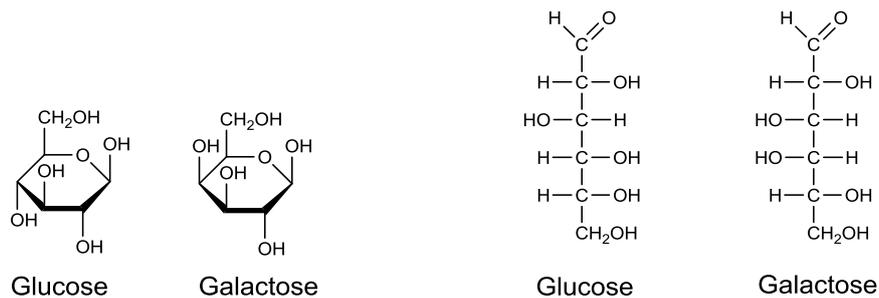


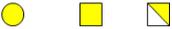
Figure 1. Représentation du glucose et du galactose. Représentation d'une molécule de D-glucose et de D-galactose sous la représentation de Haworth (côté gauche de la figure) et sous forme linéaire laissant apparaître l'aldéhyde sur le premier carbone (côté droit de la figure).

Les monosaccharides constituant les glycanes les plus fréquents chez les vertébrés sont les oses neutres (D-Glucose, D-Galactose, D-xylose, L-Fucose, D-Mannose), les osamines (*N*-acétyl-D-Glucosamine et *N*-acétyl-D-Galactosamine), les acides uroniques (Acide D-glucuronique et acide L-iduronique) et les acides sialiques dont le plus fréquent chez l'homme est l'acide *N*-acétylneuraminique (Neu5Ac). Pour simplifier leur représentation, le professeur Ajit Varki et ses collaborateurs ont proposé une nouvelle représentation qui permet d'identifier facilement les monosaccharides (Varki et al., 2009). Ceux-ci sont résumés dans la figure 2.

Hexoses: Cercles

N-acetylhexosamines: Carrés

Hexosamines: Carrés divisés en diagonale

- Stéréochimie du **galactose**: Jaune entouré de noir 
- Stéréochimie du **glucose**: Bleu entouré de noir 
- Stéréochimie du **mannose**: Vert entouré de noir 
- **Fucose**: Triangle rouge entouré de noir 
- **Xylose**: Etoile à 5 branches orange entouré de noir 

Monosaccharides acides: Diamants

- **Neu5Ac**: Violet entouré de noir 
- **Neu5Gc**: Bleu clair entouré de noir 
- **KDN**: Vert entouré de noir 
- **GlcA**: Moitié supérieure bleue entourée de noir 
- **IdoA**: Moitié inférieure marron entourée de noir 
- **GalA**: Moitié gauche jaune entourée de noir 
- **ManA**: Moitié droite verte entourée de noir 

Figure 2. Représentation des différents monosaccharides. Représentation proposée par Varki et collaborateurs en 2010 (Varki et al., 2009).

Les monosaccharides sont liés entre eux par des liaisons glycosidiques pour former des molécules plus complexes appelées glycanes. Ceux-ci trouvent la dénomination d'oligosaccharide si le nombre de monosaccharides le composant est inférieur à 20, ou de polysaccharides si ce nombre est supérieur. Le glycanne peut être lié de façon covalente soit à une protéine soit à un lipide. Dans les 2 cas, ce complexe prend le nom de glycoconjugué. On peut aussi trouver des monosaccharides dit libres, c'est-à-dire non liés.

Le glycanne est lié de plusieurs façons à la molécule sous-jacente. Il peut être lié soit à un atome d'azote (symbole chimique : N), généralement au niveau d'un résidu asparagine des protéines, soit à un atome d'oxygène (O) d'un résidu de sérine ou de thréonine des protéines (Figure 3), soit à un atome de carbone (C) d'un résidu de tryptophane d'une protéine ou encore à un atome de soufre (S) d'un résidu de cystéine.

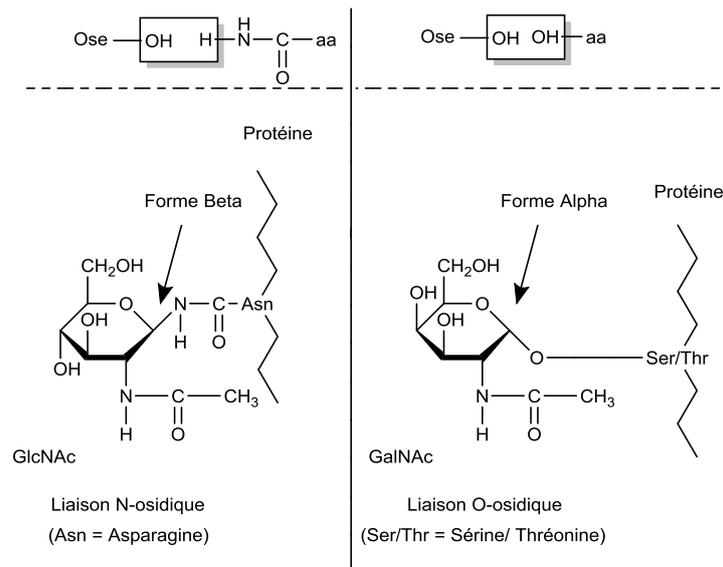


Figure 3. Liaison N-osidique et O-osidique d'un monosaccharide sur une protéine.

Selon l'atome qui permet la liaison on parle de N-, O-, C- ou S-glycosylation de la protéine en rapport avec le symbole atomique de l'élément concerné. La N- et O-glycosylation sont les plus représentées dans une cellule eucaryote. Les glycoconjugués sont nombreux et variés car une seule glycoprotéine peut être porteuse de plusieurs types de glycosylation. Un glycanne peut être aussi porté par un lipide et on parle alors de glycolipide. On trouve également les protéoglycanes qui sont des glycoconjugués dont le squelette protéique présente une liaison covalente avec un ou plusieurs glycosaminoglycane(s) (GAGs) qui sont des polysaccharides linéaires et hétérogènes, constitués d'unités disaccharidiques répétitives. La biosynthèse de ces molécules complexes est un mécanisme qui implique plusieurs réactions successives faisant intervenir de nombreuses enzymes compartimentalisées, plusieurs glycosyl-nucléotides et leurs transporteurs, ainsi que de nombreux autres facteurs présents dans la cellule eucaryote. Selon les différents types de glycosylation évoqués précédemment, on distingue de nombreuses voies de biosynthèse.

B. Les acides sialiques

Les acides sialiques font partie d'une famille de monosaccharides à 9 carbones fréquemment retrouvés en position terminale des molécules sialylées chez les deutérostomes (animaux caractérisés par le fait que le blastopore forme l'anus à l'étape de gastrulation). Chez ces animaux, les acides sialiques sont impliqués dans les interactions hôte/pathogène, la réponse immunitaire, les fonctions neuronales et d'autres fonctions essentielles. Ils sont également des composés présents chez les cellules procaryotes (cellules sans noyaux avec une rare présence d'organites) où on les retrouve sous forme de lipopolysaccharides au niveau de l'enveloppe cellulaire et de la capsule des bactéries Gram⁻ (Petit et al., 2018). Les acides sialiques ont en commun un carboxylate (-COOH ionisé

à pH physiologique) sur le carbone 1 (C1) attaché au C2 anomérique porteur d'un groupement carbonyle dans la forme ouverte de l'acide sialique et une chaîne glycérol-like (HOH₂C-CHOH-CH₂OH) rattaché au C6. On compte plus de 50 molécules d'acide sialique naturelles. La variété de ces molécules résulte de la modification de la structure de l'acide sialique par l'introduction de groupements tels que le lactoyl (CH₃CH(OH)CO-), le sulfate (SO₄²⁻), le méthyle (CH₃), l'acétyle (COCH₃) et le phosphate (H₂PO₄⁻) sur les groupements hydroxyles des carbones 4, 7, 8 et 9 (Varki et al., 2015). Depuis le développement de la chimie, il est possible d'ajouter de nouveaux groupements synthétiques sur les carbones, l'oxygène et l'azote de l'acide sialique lui permettant d'acquérir de nouvelles capacités réactives qui sont utilisées pour l'étude des sialoglycoconjugués ou celle des enzymes de biosynthèse, les sialyltransférases.

Chez l'Homme, l'acide sialique principalement retrouvé est l'acide *N*-acétylneuraminique (Neu5Ac) porteur d'un groupement acétyle (COCH₃) sur le carbone 5. De façon moins fréquente, on peut retrouver du Neu5Gc provenant principalement de la nutrition carnée (Tangvoranuntakul et al., 2003). En effet, l'espèce humaine est incapable de synthétiser cet acide sialique car elle est homozygote à une délétion de l'exon 6 du gène de la CMAH (la CMP-sialic acid hydroxylase) causé par l'élément transposable de type Alu conduisant à la production d'une enzyme tronquée et inactive (Chou et al., 2002). Chez les autres vertébrés, l'activité d'hydroxylase de cette enzyme CMAH est d'ajouter un groupement hydroxyle (OH) sur l'acétyle pour former un groupement glycolyle (COCH₃OH). Le Kdn (Deaminoneuraminic acid) est le moins fréquent chez les vertébrés supérieurs mais est très présent chez les vertébrés inférieurs, environ 1:100 à 1:1000 (Inoue and Kitajima, 2006). Cependant, la raison de cette sous-expression chez les vertébrés supérieurs reste encore à élucider. Il ne possède pas de chaîne *N*-acétyle comme pour le Neu5Ac et le Neu5Gc mais un groupement hydroxyle associé directement au C5 (Figure 4). On le retrouve principalement au niveau des globules rouges et les cellules cancéreuses d'ovaire (Inoue et al., 1998). Il n'est pas synthétisé par déacétylation et déamination mais suit une voie métabolique propre semblable à celle de l'acide sialique où le précurseur est un résidu de Mannose et non pas du ManNAc. Certaines enzymes impliquées dans cette voie de biosynthèse sont spécifiques au Kdn alors que d'autres sont communes aux 2 voies. On retrouve également des monosaccharides assimilés aux acides sialiques car il apparaît qu'ils partagent un ancêtre commun mais sont différents au niveau structural. C'est le cas du Kdo qui possède 8 carbones et un ancêtre commun avec le Kdn (Varki and Schauer, 2009).

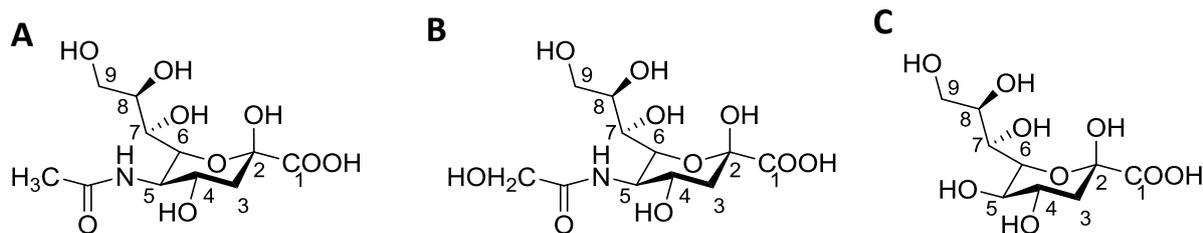


Figure 4. Représentation des principaux acides sialiques retrouvés chez les mammifères. A) Neu5Ac B) Neu5Gc C) Kdn

Parmi les modifications naturelles de l'acide sialique on retrouve des substitutions des groupements hydroxyles par des groupements acétyle, glycolyle, méthyle, lactyle et sulfate (Varki et al., 2015). L'une des plus répandue et étudiée est la 9-*O*-acétylation de l'acide sialique. Cette modification est réalisée grâce à l'enzyme CASD1, la *N*-acetylneuraminase 9-*O*-acetyltransferase qui utilise de l'acétyl-CoA comme substrat donneur et transfère le groupement acétyle directement sur le sialoglycane, au sein de l'appareil de Golgi (Baumann et al., 2015). Au niveau biologique, cette modification affecte la reconnaissance du facteur H, une protéine du complément impliqué dans un mécanisme de protection des cellules du Soi, sur les cellules porteuses d'acide sialique 9-*O*-acétylé, ce qui diminue la reconnaissance par les lectines de type-I incluant les sialoadhésines et le CD22. Les sialoadhésines sont des molécules d'adhérence portées uniquement par les macrophages, elles reconnaissent principalement les structures de type Sia α 2-3Gal β 1-3GalNAc (Crocker et al., 1991) alors que le CD22 reconnaît les structures de type Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4Glc(NAc) (Powell and Varki, 1994). Ainsi cette modification de l'acide sialique diminue les capacités de homing de ces cellules. D'autre part, la 9-*O*-acétylation affecte également l'attachement à certains virus. Les influenza virus C, virus qui cause la grippe, ont une plus grande affinité vis-à-vis des acides sialiques 9-*O*-acétylés contrairement aux coronavirus OC43 et BCV (Rogers et al., 1986).

Les glycoconjugués sont nombreux et possèdent des structures différentes leur conférant des propriétés propres utilisées par la cellule saine ou pathologique. Leur régulation est influencée par la conformation de la protéine permettant ou non son passage dans l'appareil de Golgi, par la compartimentalisation des différents acteurs impliqués dans la glycosylation, par les enzymes du métabolisme des glycosyl-nucléotides et leur transporteur ou encore par la localisation et le taux d'expression des glycosyltransférases et glycosidases. Tous ces facteurs contribuent à la diversité structurale des glycoconjugués mais on connaît encore peu de choses concernant cette organisation.

II. La machinerie de glycosylation

La glycosylation est une modification majeure ayant lieu sur des protéines et des lipides. Elle permet l'association d'un monosaccharide à l'un de ces conjugués et est régie par tout un ensemble d'acteurs. Dans cet ouvrage, je vais utiliser la nomenclature HUGO (Human Gene Organization) pour nommer les gènes. De même, la nomination des protéines sera en accord avec cette nomenclature. (Ex : Le gène *ST6GAL1* humain exprimera la protéine ST6GAL1).

A. Les glycosyl-nucléotides

Les différentes étapes de glycosylation nécessitent l'implication de différents facteurs. Le premier facteur est la présence de glycosyl-nucléotide. Le glucose est la principale source énergétique pour les organismes, notamment l'Homme, et est capable d'être transformé en chacun des monosaccharides utilisables pour la glycosylation (figure 5).

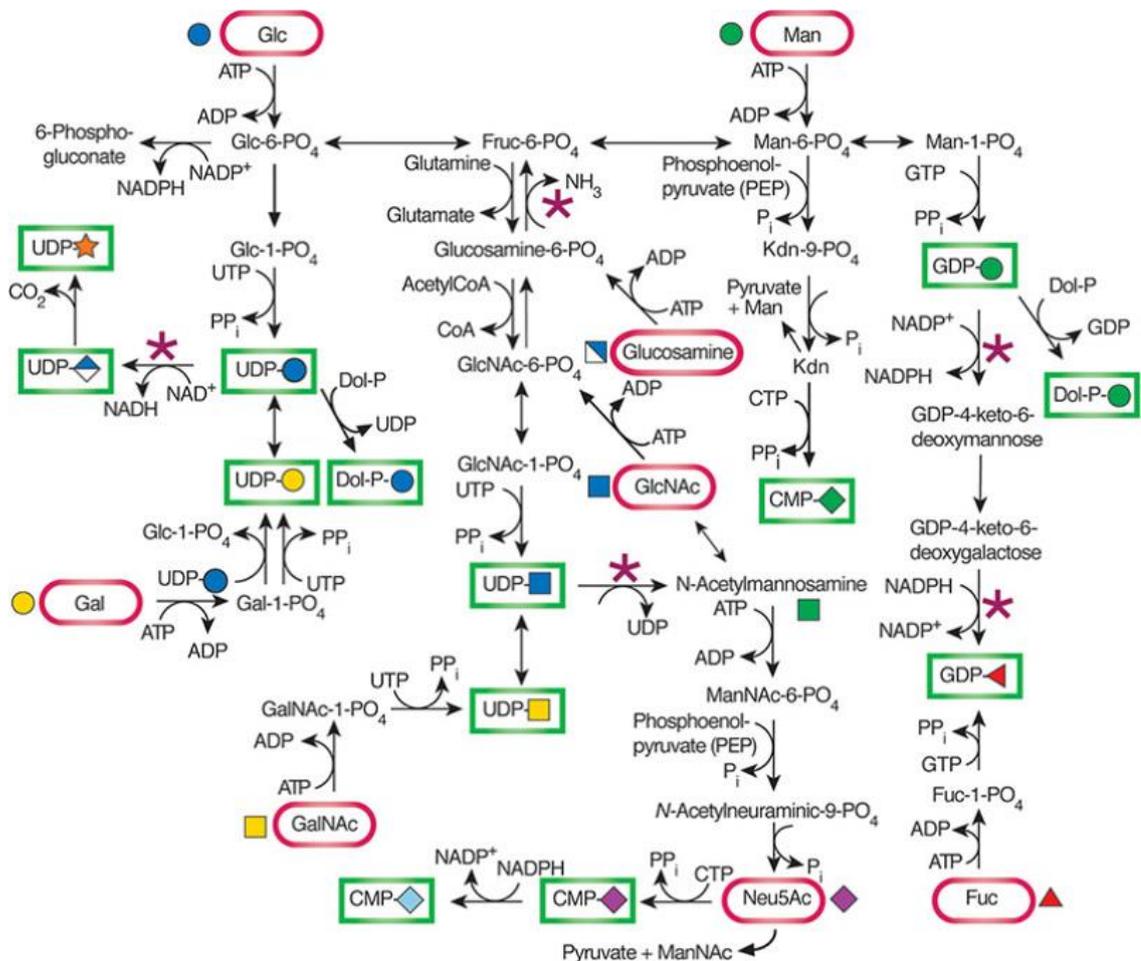


Figure 5. Biosynthèse et voie de conversion des différents monosaccharides. Tiré de Essentials of glycobiology 3rd edition (Freeze et al., 2015).

La plupart des organismes peuvent synthétiser les autres monosaccharides nécessaires à la biosynthèse des glycanes. Néanmoins, certains d'entre eux peuvent être recyclés à partir d'un glycanne après sa dégradation dans les lysosomes, ceux-ci doivent ensuite rejoindre leur voie métabolique pour être de nouveau activés. Pour être activés, ces monosaccharides doivent être liés à un nucléotide portant un ou plusieurs groupements phosphate, qui sont les substrats utilisés par les glycosyltransférases. Parmi tous les monosaccharides, seul l'acide sialique est associé à un nucléotide monophosphate. Les principaux glycosyl-nucléotides sont le :

- GDP-fucose
- GDP-mannose
- UDP-Gal
- UDP-GlcNAc
- UDP-Glc
- UDP-GalNAc
- UDP-xylose
- UDP-GlcA
- CMP-Neu5Ac

Ces glycosyl-nucléotides activés sont synthétisés majoritairement dans le cytosol selon 3 différentes réactions enzymatiques. La première réaction permet la formation d'un monosaccharide phosphorylé par l'action d'une première kinase puis d'une seconde permettant de former un nucléotide diphosphate relié au monosaccharide. La seconde réaction permet la conversion d'un monosaccharide diphosphate en un deuxième monosaccharide diphosphate. C'est le cas de l'UDP-GlcA formé à partir d'UDP-Glc ou encore du CMP-Neu5Gc formé à partir du CMP-Neu5Ac (Figure 6). La troisième et dernière réaction correspond à l'échange d'un nucléotide phosphate contre un second nucléotide phosphate activé. C'est le cas du galactose phosphorylé échangé contre le glucose phosphorylé de l'UDP-Glc formant l'UDP-Gal et du Glc-1-P (Freeze et al., 2015).

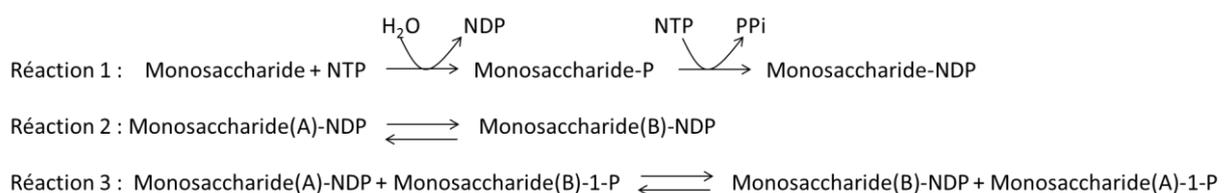


Figure 6. Réactions permettant la synthèse de glycosyl-nucléotides. La première réaction concerne l'ajout d'un résidu de phosphate puis d'un nucléotide monophosphate. La deuxième concerne la conversion d'un monosaccharide A activé en monosaccharide B activé. La troisième démontre l'échange d'un nucléotide activé avec un monosaccharide phosphaté. Inspiré de Essentials of Glycobiology (Freeze et al., 2015).

B. Les transporteurs des glycosyl-nucléotides

Une fois synthétisé, chaque glycosyl-nucléotide doit rejoindre le compartiment cellulaire où se trouvent les glycosyltransférases qui vont catalyser leur transfert sur le glycanne en cours de synthèse. Chaque glycosyl-nucléotide possède un transporteur qui lui est propre et ceux-ci sont résumés dans la figure 7. Ces transporteurs permettent l'entrée des glycosyl-nucléotides au sein de l'appareil de Golgi ou du réticulum endoplasmique. Faisant partie de la famille des antiporteurs, ces transporteurs échangent l'entrée d'un glycosyl-nucléotide avec un nucléotide monophosphate. Comme la majorité des nucléotides sont porteurs de 2 phosphates, il est nécessaire qu'une phosphatase agisse sur le nucléotide issu de la glycosylation après transfert du monosaccharide sur le glycanne en cours de maturation. Par ailleurs, le transport du nucléotide vers le compartiment golgien ou réticulaire peut être inhibé par la présence de ce nucléotide dans le cytosol (Freeze et al., 2015). Une fois dans son organelle cible, le glycosyl-nucléotide va pouvoir être utilisé par les enzymes appropriées.

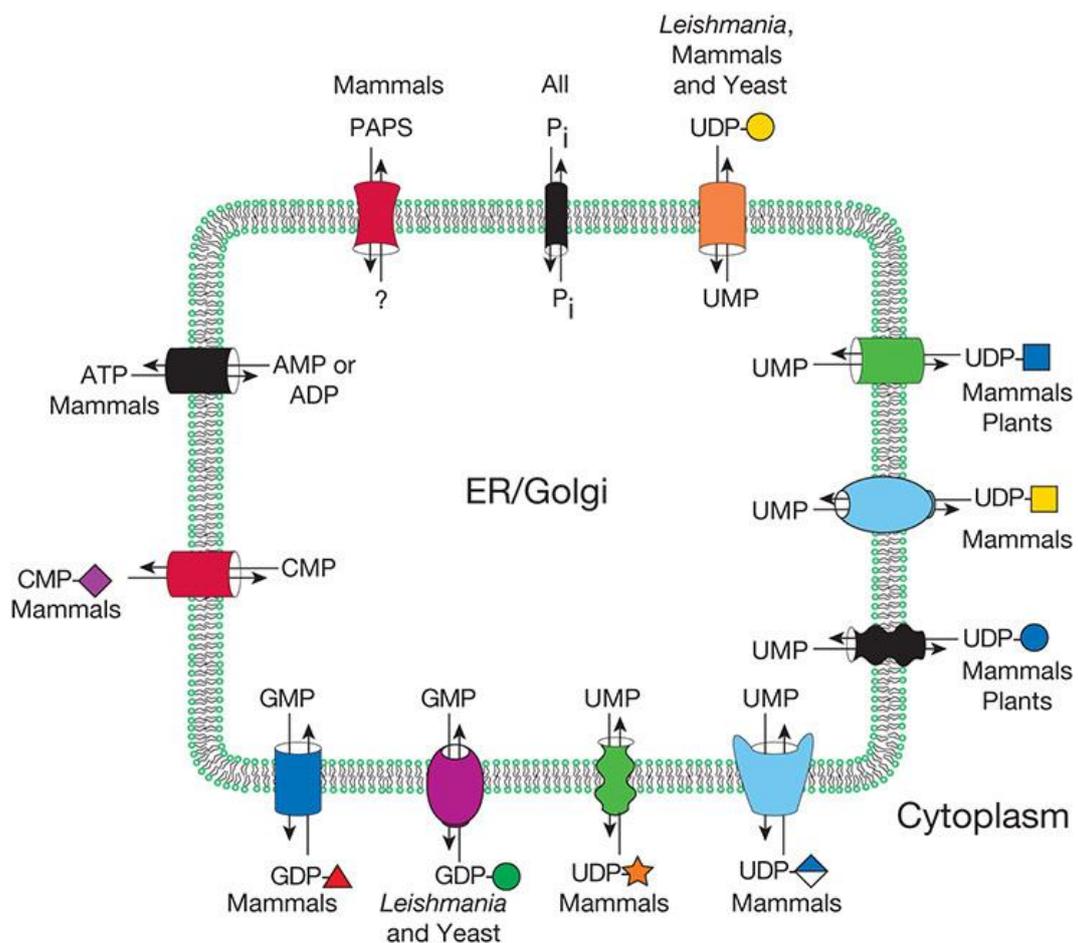


Figure 7. Schéma des transporteurs connus pour les glycosyl-nucléotides. Tiré de Essentials of Glycobiology (Freeze et al., 2015)

C. Les glycosyltransférases

L'autre facteur important pour réaliser la glycosylation est la présence de glycosyltransférases. Ces enzymes vont catalyser le transfert du monosaccharide activé sur le substrat accepteur. Environ 1% du génome est dédié à l'expression de glycosyltransférases et d'autres protéines impliquées dans la glycosylation. Ces enzymes sont des protéines membranaires de type II qui possèdent, de ce fait, une courte queue cytoplasmique, un unique domaine transmembranaire localisé dans la membrane de l'appareil de Golgi, une région tige et un domaine catalytique orienté vers la lumière de l'appareil de Golgi (Harrus et al., 2018). Ces glycosyltransférases sont des enzymes de type Leloir signifiant qu'elles utilisent un monosaccharide activé pour réaliser son transfert. La base de données CAZY (Carbohydrate Active enZYme) regroupe toutes les enzymes actives sur les monosaccharides et les classe selon leur structure et leur activité enzymatique (<http://www.cazy.org>). Cette classification permet de révéler la relation d'évolution entre ces enzymes, de fournir des informations concernant leur propriété enzymatique et illustre la difficulté de regrouper les membres d'une même famille avec leur spécificité de substrat. Les données structurales connues des différentes glycosyltransférases cristallisées ont permis de repérer 2 organisations majeures : le repliement de type GT-A et de type GT-B. Le type GT-A possède 2 domaines, le premier est impliqué dans la liaison au nucléotide et le second dans la liaison avec l'accepteur. Le type GT-B est caractérisé par 2 sous domaines de Rossmann, des domaines impliqués dans la liaison avec les nucléotides (Bourne and Henrissat, 2001). D'un point de vue structural, les GT-A et GT-B ont des arrangements spatiaux similaires avec des alternances de chaîne α et de feuillet β . Les membres de la famille GT-A contiennent 6 feuillets β numérotés de 1 à 6 en partant de l'extrémité N-terminal jusqu'au C-terminal en montrant une topologie de type 321465 où le 5^{ème} feuillet est en anti-parallèle avec les autres (Figure 8). Une autre caractéristique des enzymes de type GT-A est qu'elles possèdent le motif Asp-X-Asp (DxD) qui est un motif de liaison à des cations divalents utilisés comme co-facteur (Harrus et al., 2018). Les enzymes de type GT-B ont une topologie de feuillet β de type 321456 et connectés entre eux. Il existe des variants de ces familles caractérisés par un ordre différent des feuillets β .

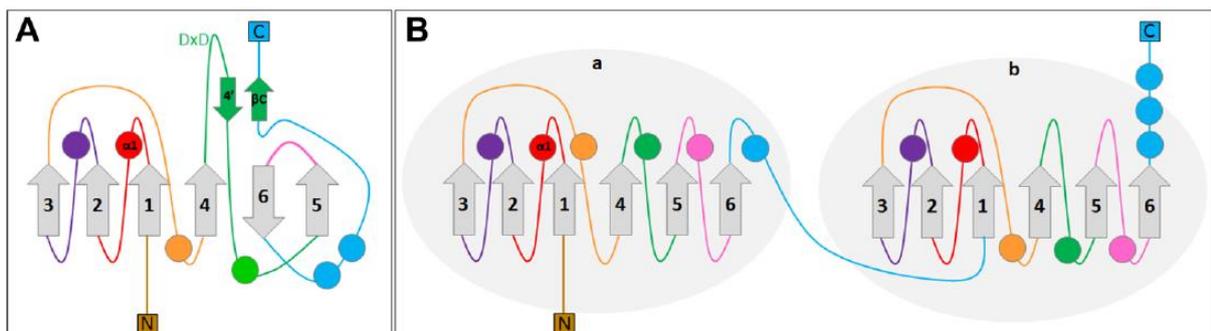


Figure 8. Représentation de la conformation des enzymes de type GT-A (Fig.A) et GT-B (Fig. B). Tiré de (Harrus et al., 2018).

Peu de choses sont connues quant aux transports spécifiques des glycosyltransférases à l'appareil de Golgi. Cependant, on peut supposer que les glycosyltransférases sont amenées au sein de cet organe grâce à des transporteurs protéiques spécifiques associés à des vésicules. On peut distinguer les complexes de type COP2 qui sont des complexes protéiques associés à des vésicules qui amènent les glycoprotéines du RE vers l'appareil de Golgi et les complexes de type COP1, capables d'effectuer des transports vers la voie antérograde, de l'appareil de Golgi vers le RE (Park et al., 2015). Il a été démontré que la Golgi Phosphoprotein3 (GOLPH3) favorise l'incorporation de ST6GAL1 et de la GCNT1 dans les vésicules de type COP1. Une déplétion de la GOLPH3 altère la correcte localisation de ces glycosyltransférases (Eckert et al., 2014).

Les protéines SNAREs sont des récepteurs qui fournissent la force nécessaire pour que les vésicules fusionnent avec la membrane de l'organe cible. Au niveau de l'appareil de Golgi on a dénombré 14 protéines SNAREs différentes. Il a été démontré que ces protéines sont capables de s'associer avec des protéines de type COP1 et COP2 pour faciliter la fusion des vésicules (Bentley et al., 2006; Malsam and Söllner, 2011).

Les GTPases de type Rab jouent également un rôle dans la dynamique vésiculaire. Un échange de GDP par du GTP permet d'opérer un changement conformationnel permettant aux Rabs de se dissocier de leur ligand membranaire et ainsi de devenir cytosolique. Cette nouvelle localisation leur permet d'interagir avec de nouveaux acteurs et ainsi cibler l'organe cible pour la vésicule contenant les glycosyltransférases (Figure 9). A titre d'exemple, il a été démontré que Rab33b et Rab6 agissent de façon coordonnée pour effectuer un rétro-transport intra-golgien, du trans-Golgi vers le cis-Golgi, dans la voie rétrograde. De plus, cette même étude montre qu'en inhibant la production de Rab33b, par l'utilisation de siRNA, la localisation de la GALNACT2 (GALNT2) est restreinte au RE (Starr et al., 2010). Cet effet n'est pas visible avec un siRNA dirigé contre l'ARNm de Rab6. Par ailleurs, ces protéines Rabs sont également impliquées dans la structure de l'appareil de Golgi. Une déficience en Rab6, la protéine Rab la plus abondante de l'appareil de Golgi crée une augmentation du nombre de saccules golgiennes (Liu and Storrie, 2015). Les auteurs pensent que cela se produit *via* une dérégulation des vésicules de transport.

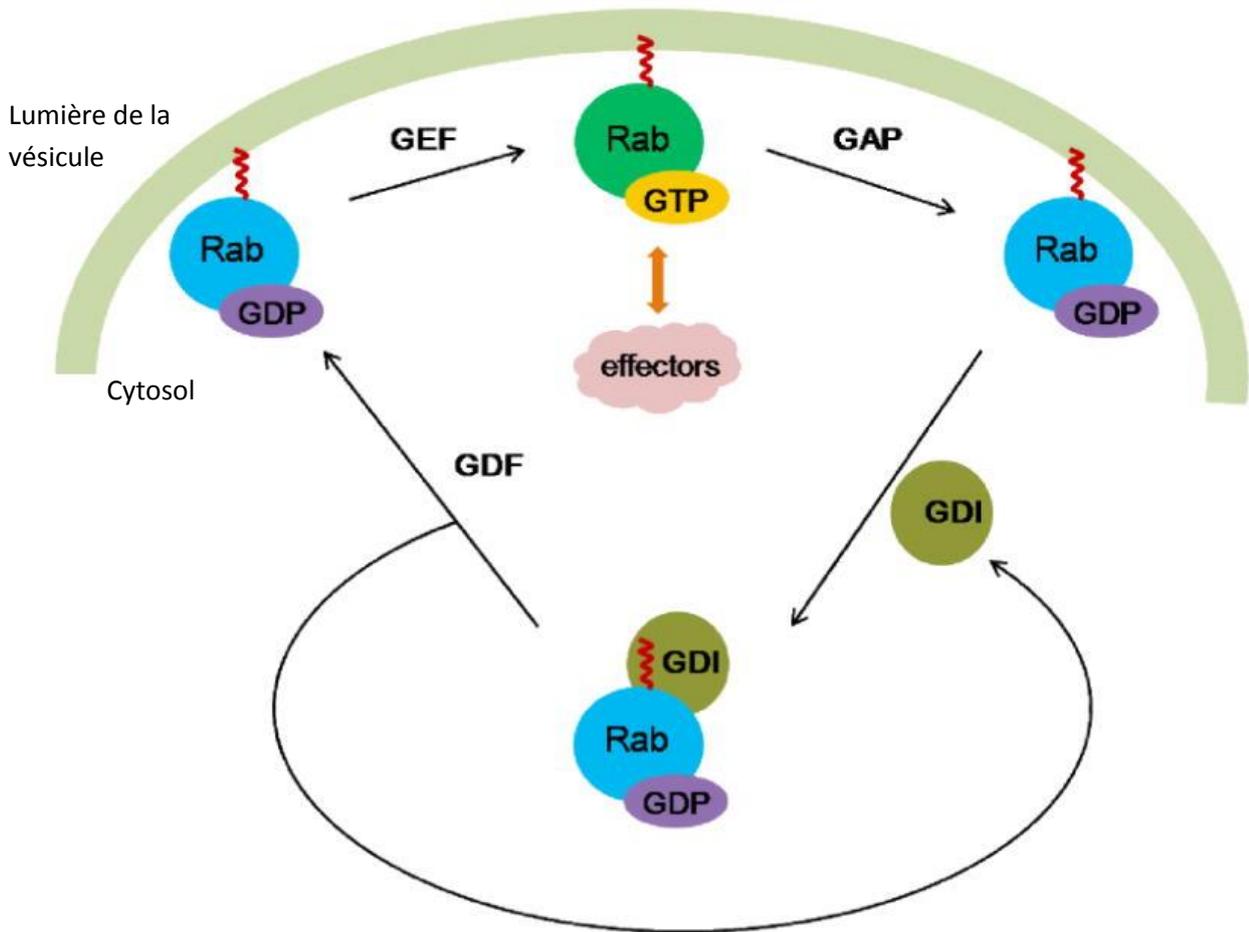


Figure 9. Schéma explicatif du cycle d'association et dissociation des protéines Rab. Le facteur GDF (GDP displacement factor) remplace le facteur GDI (GDP dissociation inhibitor) sur la protéine Rab associée au GDP pour favoriser son ancrage membranaire. Ensuite la GEF (GDP/GTP exchange factor) remplace la molécule de GDP par du GTP lui permettant d'interagir avec ses effecteurs et réguler le trafic vésiculaire. Enfin, la GAP (GTPase activating protein) hydrolyse le GTP pour former du GDP libérant la protéine Rab. Cette protéine inactive est ensuite relarguée dans le cytosol et recyclée par la protéine GDI. Tiré de (Liu and Storrie, 2012)

On peut également distinguer les COG (Conserved Oligomeric Golgi complex). Les COG, au nombre de 8, sont des sous-unités cytoplasmiques qui se complexent avec d'autres acteurs impliqués dans le trafic vésiculaire (Figure 10) pour amener les vésicules vers le compartiment cellulaire cible, tel que l'appareil de Golgi. Il a été démontré que les glycosyltransférases MAN2A1, MGAT1, B4GALT1 et ST6GAL1 ont des problèmes de localisation lorsque les COG sont sous-exprimés par des siRNAs (Pokrovskaya et al., 2011). De même, au sein d'un organisme, il a été démontré que les COG sont impliqués dans des pathologies impactant la glycosylation comme il a été démontré pour COG1 à l'origine de CDG (Congenital Disorders of Glycosylation) de type II (Foulquier et al., 2006).

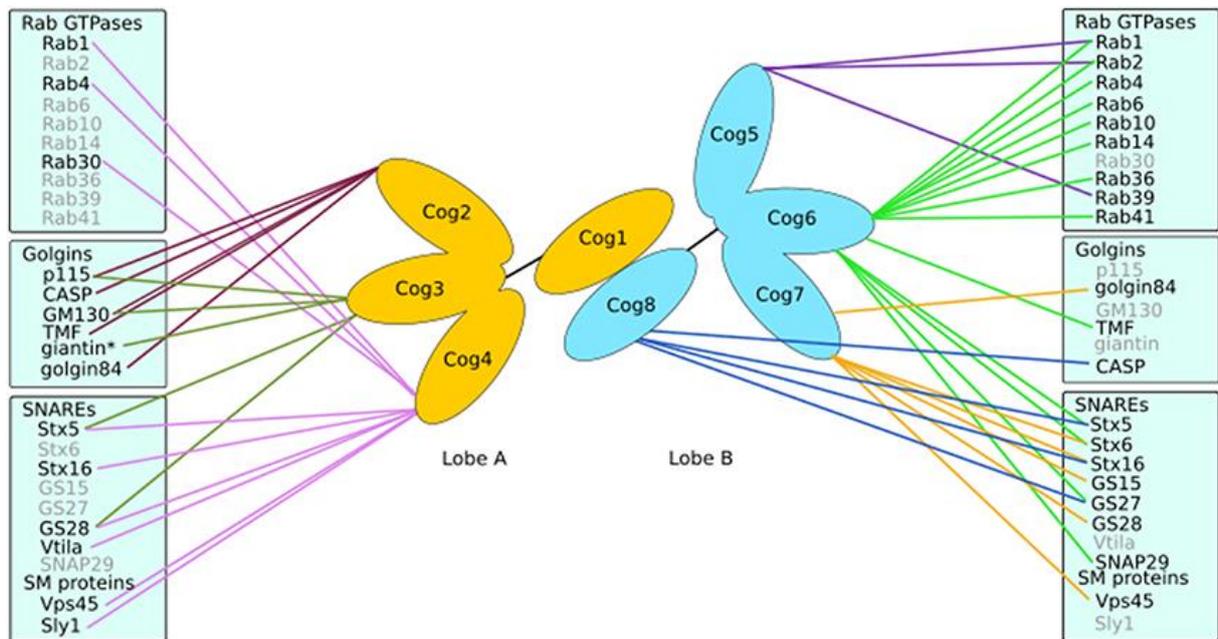


Figure 10. Schéma illustrant l'interaction des complexes COG avec les facteurs impliqués dans le trafic vésiculaire. Le complexe COG est composé de 2 lobes, le lobe A composé des COG 1-4 et le lobe B composé des COG 5-8. Chaque sous-unité a été démontrée comme interagissant avec les nombreux facteurs impliqués dans le trafic vésiculaire. Tiré de (Fisher and Ungar, 2016).

Une fois dans l'appareil de Golgi, les glycosyltransférases doivent y rester pour réaliser la glycosylation. Il existe plusieurs théories permettant d'expliquer la rétention des glycosyltransférases dans l'appareil de Golgi. La première énonce que la longueur et l'hydrophobicité du domaine transmembranaire sont spécifiques de l'épaisseur de la bicouche lipidique de la membrane golgienne. Ainsi, l'interaction du domaine transmembranaire avec la bicouche lipidique permet d'ancrer les protéines sur la membrane de cet organite (Bretscher and Munro, 1993). La deuxième propose que le maintien dans l'appareil de Golgi se fait *via* la formation d'homo- ou hétérooligomères de glycosyltransférases grâce à la formation de ponts disulfures (Machamer, 1991; Nilsson et al., 1993). Cependant aucune de ces 2 hypothèses n'est entièrement satisfaisante et n'explique vraiment le mécanisme moléculaire de rétention des glycosyltransférases golgiennes. Par ailleurs, il est connu que des modifications de l'environnement intracellulaire modifient la localisation des glycosyltransférases. C'est notamment le cas du pH en ce qui concerne la GALNT2, la NAGT2 et la B4GALT1. En effet, celles-ci sont mal-localisées lorsque des cellules LS174T sont traités avec du NH_4Cl , qui diffuse de l'ammoniac (NH_3) dans la cellule, ou avec de la bafilomycine A1, un inhibiteur des pompes ATPases H^+ et K^+ présentes dans la voie de sécrétion et endocytaire (Axelsson et al., 2001). Ces problèmes de localisation sont également corrélés à la présence d'O-

glycannes dont la structure est altérée. Le pH influe également sur l'activité de certaines glycosyltransférases, c'est le cas des sialyltransférases de mammifères dont le maximum d'activité se situe à un pH situé à 6.5 – 7 (Lammers and Jamieson, 1986). *In vivo*, l'équipe de Kellokumpu a démontré qu'une augmentation de pH intra-golgien de 0.2 unités suffisait à modifier la sialylation en α 2-3 de la protéine ACE (Antigène carcino-embryonnaire) et à induire une localisation de ST3GAL1 dans les compartiments endosomaux (Rivinoja et al., 2009). Le pH peut être régulé de 3 façons différentes : par une pompe à proton ATP-dépendante qui fait entrer des protons dans l'appareil de Golgi, par la conductance d'un contre-ion (généralement Cl⁻) qui permet de contrer l'excès de charge positive et par une fuite de proton *via* un transporteur. Le pH est de 7.2 dans le RE et descend au fur et à mesure de la voie de sécrétion atteignant 6.2 dans le *trans*-Golgi et allant jusqu'à 5 dans les lysosomes.

La présence d'ions peut également moduler l'activité de certaines glycosyltransférases. Les galactosyltransférases utilisent l'UDP-galactose comme donneur de substrat et nécessitent la présence de manganèse pour fonctionner (Prabhu et al., 2018). Les groupements carboxyles de l'acide glutamique et l'acide aspartique forment une liaison de coordination avec cet ion permettant l'activité catalytique de l'enzyme (Tsutsui et al., 2013). D'autres cations divalents peuvent avoir un effet inhibiteur sur les galactosyltransférases comme le zinc. Une étude de Prabhu *et al.* montre que l'activité des galactosyltransférases dans un lysat cellulaire est diminuée lorsque la quantité de zinc est augmentée (Prabhu et al., 2018). Ces expériences tendent à démontrer que, même si le rôle des cations n'est pas clairement établi, ceux-ci ont un effet sur le fonctionnement des enzymes et la glycosylation finale des glycoconjugués. Tous ces acteurs impliqués dans la machinerie de glycosylation agissent de concert pour réaliser la biosynthèse des glycoconjugués.

III. Biosynthèse des glycoconjugués sialylés

A. Métabolisme de l'acide sialique

Les voies de biosynthèse de l'acide sialique sont différentes selon l'organisme considéré (vertébrés ou invertébrés, eucaryotes ou procaryotes) et je ne parlerai ici que de la voie métabolique conduisant à la synthèse du CMP-Neu5Ac chez les mammifères. Cette voie de biosynthèse est originale comparée aux voies des autres monosaccharides car elle est compartimentalisée et ne se fait donc pas qu'au niveau du cytosol. C'est pourquoi, elle est particulièrement intéressante et intrigue encore de nombreux chercheurs.

La voie de biosynthèse de l'acide sialique débute dans le cytosol, avec une molécule de glucose qui est ensuite phosphorylée sur le carbone 6. Ce glucose-6-phosphate est ensuite isomérisé en fructose-

6-phosphate qui peut être utilisé dans la glycolyse ou dans la voie de biosynthèse des acides sialiques. Dans cette dernière, ce fructose-6-phosphate est transformé en glucosamine-6-phosphate puis en *N*-acetyl-glucosamine-6-phosphate et enfin en *N*-acetylglucosamine-1-phosphate pour donner de l'UDP-GlcNAc. Ce nucléotide sucre peut être utilisé pour la synthèse des *N*-glycannes ou utilisé par la GNE (UDP-*N*-acetylglucosamine 2-epimerase/ *N*-acetylmannosamine kinase), une enzyme qui possède chez les mammifères deux fonctions enzymatiques clés dans la biosynthèse du CMP-Neu5Ac. Sa première fonction est de transformer l'UDP-GlcNAc en ManNAc. La deuxième fonction est de phosphoryler le ManNAc, grâce à sa fonction kinase, en ManNAc-6-phosphate. L'enzyme suivante, la NANS (*N*-Acetyl Neuraminic acid synthase) permet de former le Neu5Ac-9-phosphate à partir du ManNAc phosphorylé. Ensuite la phosphatase NANP (*N*-Acetyl Neuraminic Phosphatase) permet de libérer le phosphate pour former le Neu5Ac. Dans le noyau de la cellule, le Neu5Ac et le CTP (cytidine triphosphate) sont utilisés par la CMAS (CMP-*N*-acetyl neuraminic synthetase, ou CSS) en présence de magnésium, son cofacteur pour former le CMP-Neu5Ac.

Ce CMP-Neu5Ac nouvellement formé transite dans le cytoplasme, où il est capable d'inhiber l'activité de la GNE pour moduler la production d'acide sialique, avant d'entrer dans l'appareil de Golgi grâce à un transporteur spécifique nommé SLC35A1. Il s'agit d'un antiporteur qui échange une molécule de CMP (issu de l'utilisation du CMP-Neu5Ac par les sialyltransférases) qui retourne dans le cytosol pour suivre la voie métabolique des pyrimidines, contre l'entrée d'une nouvelle molécule de CMP-Neu5Ac. Dans l'appareil de Golgi, le CMP-Neu5Ac est utilisé comme donneur d'acide sialique par l'une des 20 sialyltransférases décrites chez l'Homme. Les acides sialiques présents sur le glycoconjugué peuvent également recevoir un groupement acétyle supplémentaire dans cet organite (Figure 11).

L'acide sialique présent de façon libre dans le milieu de culture peut également être internalisé par la cellule. Celui-ci est internalisé par une voie endocytaire non clathrine-dépendante pour se retrouver dans les lysosomes et en sortir par le transporteur SLC17A5 pour se retrouver dans le cytosol. Quant au précurseur de l'acide sialique, le dérivé mannosylé, il peut traverser la membrane plasmique par diffusion passive et être ensuite métabolisé en acide sialique (Figure 11). Ces voies sont similaires entre le Neu5Ac et le Neu5Gc (Bardor et al., 2005; Gilormini et al., 2016a).

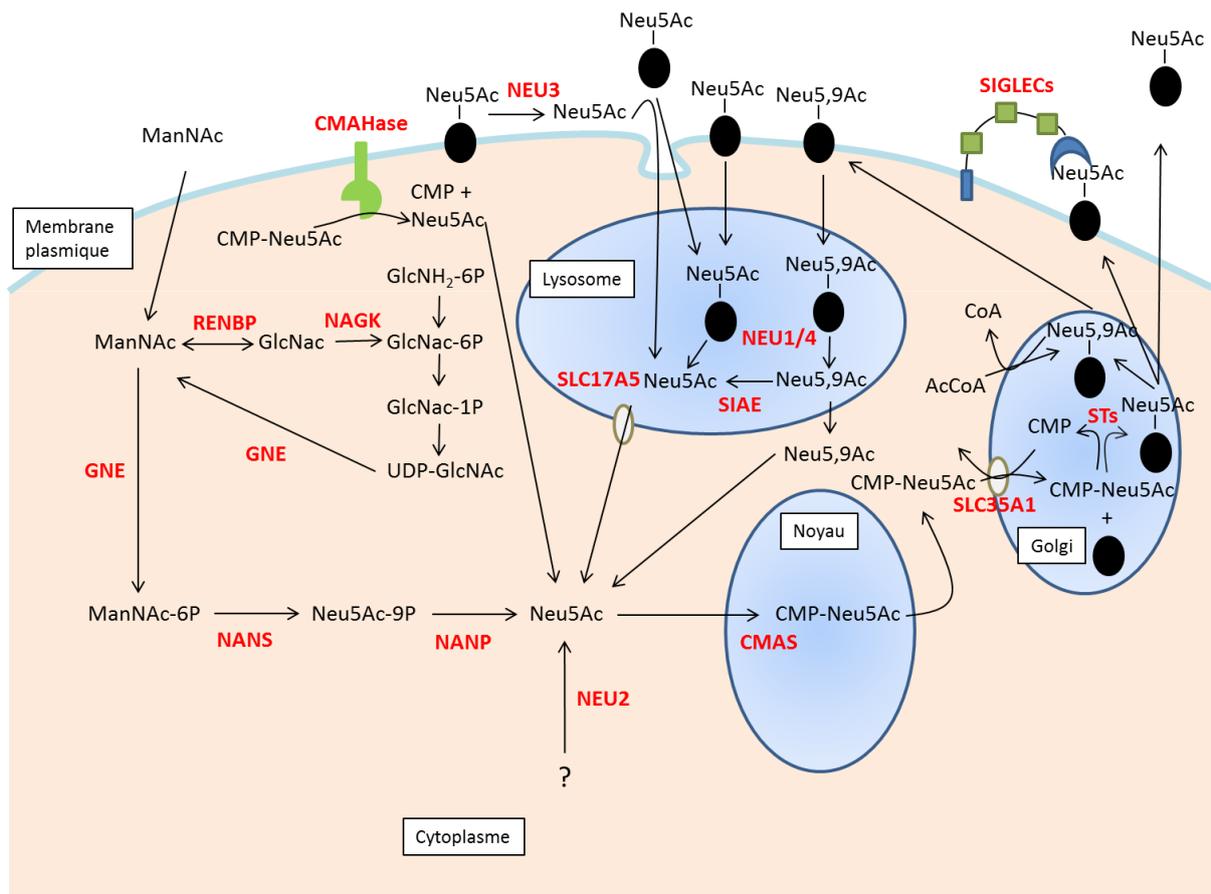


Figure 11. Trafic de l'acide sialique chez les vertébrés. Inspiré de essentials of glycobiology 2nd edition.

Dans la cellule, l'acide sialique est également catabolisé selon les besoins cellulaires. On peut distinguer plusieurs niveaux de régulation impliquant l'acide sialique. La dégradation du CMP-Neu5Ac en une molécule de CMP et de Neu5Ac par l'hydrolyse de la liaison glycosidique, par la séparation de l'acide sialique avec le glycanne auquel il est lié et par la dégradation de l'acide sialique en lui-même.

En ce qui concerne la liaison entre l'acide sialique et le CMP, celle-ci peut être hydrolysée de façon non enzymatique, de par la charge négative de l'acide carboxylique (COO⁻) et celle du phosphate du CMP entraînant une répulsion entre ces 2 molécules anioniques. Cette hydrolyse est plus importante avec la durée et la température du milieu (Gilormini et al., 2016b). Il a été proposé qu'un atome métallique divalent puisse être impliqué dans la stabilisation de la liaison entre l'acide sialique et le CMP. Cet atome porteur de 2 charges positives pourrait réagir avec les 2 charges négatives et stabiliser cette liaison (Figure 12) (Kolter and Sandhoff, 1997). Par ailleurs, cette liaison peut aussi

être hydrolysée de manière enzymatique par la présence de CMP-sialic acid hydrolase au niveau de la membrane plasmique mais leur présence au sein de la cellule reste encore à confirmer (Kean, 1991; Kean and Bighouse, 1974).

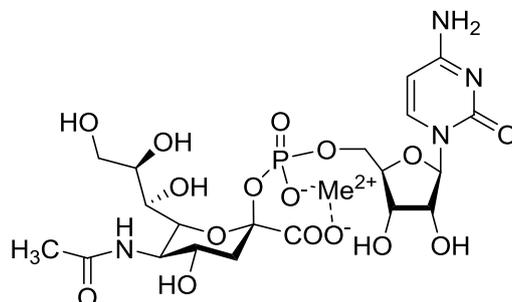


Figure 12. Implication d'un cation divalent (Me^{2+}) dans la stabilisation de la liaison entre l'acide sialique et le CMP.

On retrouve également des enzymes qui hydrolysent la liaison glycosidique entre l'acide sialique et le monosaccharide sous-jacent. Ces enzymes sont appelées neuraminidases (ou sialidases) et sont au nombre de 4 chez l'Homme avec des affinités et des localisations subcellulaires particulières. La neuraminidase 1 (Neu1) se trouve dans les lysosomes, la Neu2 se trouve dans le cytosol, la Neu3 est présente sur la membrane plasmique et enfin la Neu4 qui se trouve également dans les lysosomes (Tableau 1).

Tableau 1. Propriétés générales des neuraminidases de mammifères. Tiré de (Miyagi and Yamaguchi, 2012)

	Neu1	Neu2	Neu3	Neu4
Localisation	Lysosomes	Cytosol	Membrane plasmique	Lysosomes, mitochondrie et RE
Substrats préférés	Oligosaccharides Glycopeptides	Oligosaccharides Glycoprotéines Gangliosides	Gangliosides	Oligosaccharides Glycoprotéines Gangliosides
pH optimal	4.4 - 4.6	6.0 - 6.5	4.5 - 4.7	4.5 - 4.7

La dernière voie de régulation concerne la dégradation de la molécule d'acide sialique en elle-même et fait intervenir la sialic acid pyruvate lyase, qui se trouve dans le cytosol et entraîne la transformation du Neu5Ac en ManNAc + pyruvate. Le ManNAc ainsi formé peut ensuite retourner dans la voie de biosynthèse de l'acide sialique avec une prise en charge par la GNE.

Le métabolisme de l'acide sialique permet de réguler indirectement le niveau d'expression des glycoconjugués sialylés dont les rôles sont importants au niveau cellulaire.

B. La biosynthèse des glycoconjugués sialylés

Les glycanes sont particulièrement importants pour la protéine car ils modifient les propriétés physiques en apportant des groupements chargés ou non, volumineux et hydrophiles qui maintiennent la protéine en solution durant la mise en conformation. De plus, ils modulent également la conformation des protéines en maintenant les acides aminés proches du glycanne dans un environnement hydrophile.

1. Biosynthèse des *N*-glycanes

La *N*-glycosylation fait intervenir une liaison amide entre un résidu d'asparagine et un résidu de *N*-acétylglucosamine. La synthèse des *N*-glycanes débute dans le réticulum endoplasmique, sur le versant cytosolique. La première étape consiste en la biosynthèse du dolichol provenant de la voie de biosynthèse du mévalonate au sein du RE. L'acétyl CoA est, par l'action de plusieurs enzymes, transformé en dolichol (Larsson, 1988). Cette molécule se voit ensuite transférer une molécule de phosphate (H_3PO_4) avant de recevoir le *N*-acétylglucosamine-1-phosphate. Cette réaction est catalysée par l'enzyme DPAGT1 (GlcNAc-1-phosphotransferase) utilisant comme substrat l'UDP-GlcNAc libérant une molécule d'UMP et formant le dolichol-P-P-GlcNAc. D'autres monosaccharides sont ensuite ajoutés par différentes glycosyltransférases spécifiques jusqu'à l'obtention d'un heptasaccharide composé de 2 résidus de *N*-acétylglucosamine (GlcNAc) et 5 résidus de Mannose (Man) sur le dolichol diphosphate. Ce glycoconjugué va ensuite passer dans la lumière du RE *via* l'action d'une flippase nommée RFT1 (Helenius et al., 2002). Ensuite vont être transférés d'autres monosaccharides (4 résidus de Mannose et 3 résidus de Glucose) jusqu'à l'obtention du précurseur Glc3Man9GlcNAc2-diphosphodolichol par des enzymes spécifiques qui utilisent des substrats membranaires de type dolichol-P-monosaccharide (Dol-P-Man et Dol-P-Glc). Une fois le précurseur glycanique formé, il sera transféré sur une protéine en cours de synthèse, au sein du RE, par l'action d'un complexe enzymatique appelé oligosaccharidyltransférase (OST) (Figure 13). Le résidu d'asparagine impliqué dans la liaison glycosidique est situé dans une séquence en acide aminé particulière de la protéine. Cette séquence particulière, appelé séquon, est constituée du tripeptide Asn-X-Ser/Thr où X n'est pas une proline (Silberstein and Gilmore, 1996). Cependant, il existe des séquons de *N*-glycosylation différents mais moins fréquents. Par exemple, il a été observé une *N*-glycosylation sur une asparagine sur les séquences Asn-X-Cys ou Asn-Ser-Gly-Ala-Leu (Sato et al., 2000; Valliere-Douglass et al., 2009).

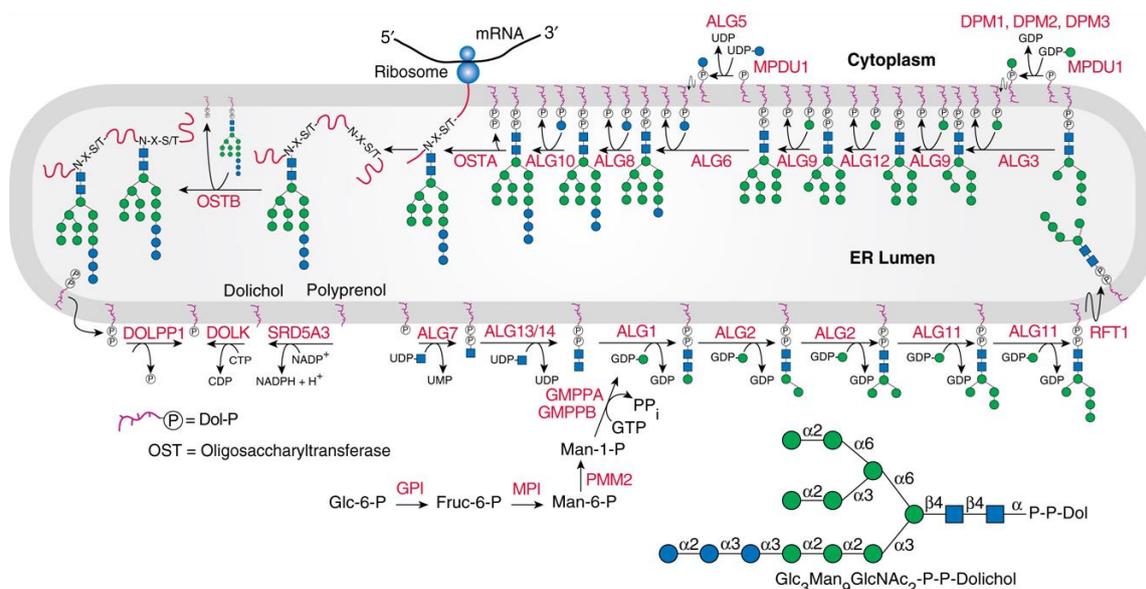


Figure 13. Réactions de synthèse des *N*-glycannes dans le RE chez une cellule eucaryote (*S. cerevisiae*). Le cycle débute sur le versant cytosolique du réticulum endoplasmique (RE) et se poursuit avec l'addition d'une *N*-acétylglucosamine (GlcNAc), ensuite un autre résidu de GlcNAc est ajouté puis 5 résidus de mannose. La flippase RFT1 transloque ce complexe vers la lumière du RE puis 4 résidus de mannose sont ajoutés ainsi que 3 résidus de glucose. Chaque étape est catalysée par une glycosyltransférase particulière spécifique du substrat. Au final, le précurseur glycanique (visible en bas à droite de la figure) est transféré sur l'asparagine d'une protéine en cours de synthèse au niveau du séquen Asn-X-Ser/Thr. Chez L'Homme, ALG7 est nommé DPAGT1, OSTA est STT3A et OSTB est STT3B. Adapté d'Essentials of Glycobiology, 3rd edition.

Une fois la protéine *N*-glycosylée et porteuse du précurseur glycanique, elle va subir les premières étapes de contrôle de sa conformation. Dans le RE, après transfert du glycanne sur la protéine, les 2 derniers résidus de glucose vont être retirés enzymatiquement de manière séquentielle par les glucosidase1 et 2. Le *N*-glycanne va ensuite être reconnu par 2 lectines spécifiques calcium dépendantes : la calnexine et son homologue soluble la calréticuline. Cette étape fait intervenir d'autres protéines chaperonnes comme la protéine disulfide isomerase chaperone ERP-57 qui vont aider la glycoprotéine à acquérir sa bonne conformation. Après contrôle par la calnexine et la calréticuline, la glucosidase2 (GANAB) va retirer le dernier glucose afin d'éviter qu'elle ne soit de nouveau reconnue par ces lectines. Si la protéine est mal conformée, un nouveau résidu de glucose est ajouté par l'UGGT (UDP-glucose : Glycoprotein Glucosyltransferase) et la bonne conformation de la glycoprotéine est contrôlée à nouveau. Une protéine bien conformée est cruciale dans le RE pour éviter des stress réticulaires, c'est pourquoi si la protéine est toujours mal conformée celle-ci va être dégradée *via* la voie ERAD (ER-Associated Degradation Pathway). Ces protéines mal

conformées sont utilisées par membres de la famille EDEM (ER degradation-enhancing α -mannosidase like protein) pour retirer 2 résidus de mannose et créer un signal d'adressage qui va faciliter sa translocation vers le cytosol où la protéine sera reconnue et dégradée par le protéasome. Si la conformation de la glycoprotéine est correcte, un résidu de mannose est clivé par la MAN1B1 et la glycoprotéine est envoyée dans l'appareil de Golgi *via* la voie antérograde grâce aux vésicules de type COP2. Une fois dans l'appareil de Golgi, le *N*-glycane va être pris en charge par les mannosidases MAN1A1, MAN1A2 et MAN1B qui vont retirer 3 résidus de mannose. Par la suite, au niveau du saccule médian de l'appareil de Golgi, la GlcNAc-transférase MGAT1 va transférer un résidu de GlcNAc en β 1,2 sur le résidu de Man en α 1,3, ce qui permettra à la MAN2A1 et MAN2A2 de retirer 2 résidus de mannose un lié en α 1-3, l'autre en α 1-6. Cette étape est importante pour distinguer les *N*-glycannes de type hybride ou complexe car si ces 2 résidus de mannose ne sont pas retirés, le glycane est destiné à devenir de type hybride (Figure 14) (Moremen and Robbins, 1991). Un autre résidu de GlcNAc est ensuite ajouté en β 1,2 sur le résidu de Man en α 1,6 par la MGAT2 puis un résidu de fucose est transféré sur le premier résidu de GlcNAc associé à l'asparagine de la glycoprotéine par une fucosyltransférase (FUT8). A cette étape les glycannes peuvent devenir des kératanes sulfates de type I où le disaccharide Gal β 1-4GlcNAc est formé par l'action successive de la B3GNT2 et la B4GALT1, B4GALT2 ou B4GALT3 et être sulfaté par la CHST1 et CHST6. Si le glycane n'est pas utilisé par la B3GNT2, un résidu de galactose est transféré sur le résidu de GlcNAc par la B4GALT1, B4GALT2 ou B4GALT3 (Funderburgh, 2002). Ensuite ST6GAL1, ST3GAL4/6 et ST8SIA2/3 et 4 agissent dans la toute dernière étape de la glycosylation pour transférer un résidu d'acide sialique en α 2,3 ou en α 2,6 ou en α 2,8 (Figure 15). *In fine*, il existe 3 grandes classes de *N*-glycannes nommées oligomannose, complexe ou hybride (Figure 14).

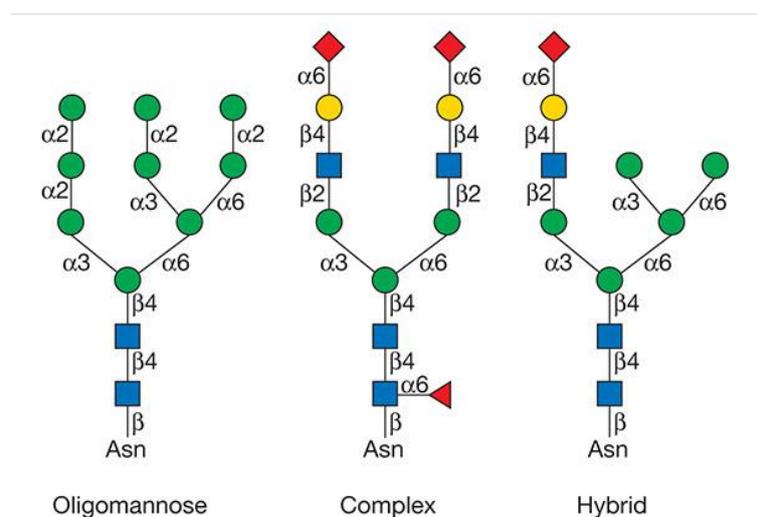


Figure 14. Les 3 grandes classes de glycane. Issue de Essentials of Glycobiology 3rd edition.

Les glycanes maturés de type complexes ou hybrides peuvent encore subir d'autres modifications pour aboutir à une plus grande variété de *N*-glycane en étant utilisés par une α 3-fucosyltransférase qui ajoute un résidu de fucose en α 1-3 sur le GlcNAc en position non-réductrice du glycanne pour former du sialyl-lewis X (sLe^x) ou encore en étant utilisés par la B4GALNT2 qui transfère un résidu de GalNAc en β 1,4 sur le résidu de galactose en position terminale pour former l'antigène glucidique de groupe sanguin Cad/Sd^a. Ceci n'est qu'un exemple qui démontre la grande complexité du processus de glycosylation qui permet d'aboutir à une grande variété de *N*-glycannes porteurs de différents antigènes comme le sLe^x ou porteurs de monosaccharides sulfatés ou non. Evidemment, la présence de ces glycanes est dépendante du niveau d'expression des glycosyltransférases, la quantité de substrats donneurs et accepteurs disponibles elle-même dépendante de la quantité des glycosyltransférases en amont et de tous les acteurs impliqués dans la machinerie de glycosylation.

Les hydrolases lysosomales, qui sont des enzymes impliquées dans la dégradation protéique et glycanique, sont dirigées vers le lysosome par une voie particulière qui requiert la présence de *N*-glycane de type oligomannose phosphorylé. Cette étape implique le transfert de GlcNAc-1-P sur le résidu de mannose au niveau du *cis*-Golgi. Ensuite une glycosidase dans le *trans*-Golgi retire le résidu de GlcNAc générant du mannose-6-phosphate reconnu par le récepteur au mannose-6-phosphate. Ce récepteur transporte ensuite les hydrolases au sein de compartiments acides tels que les lysosomes (Figure 15).

La figure 15 montre également différentes lignées cellulaires d'ovaire de hamster chinois (CHO) modifiées et porteuses de mutations au sein de cette voie de biosynthèse, ce qui permet de générer différents types de glycanes au niveau de leur membrane plasmique. La lignée des CHO-Lec1 est déficiente en MGAT1 ce qui empêche cette lignée d'avoir des *N*-glycannes de type complexe ou hybride. Les CHO-Lec8 sont déficientes au transporteur d'UDP-Gal (SLC35A2) entraînant des glycanes agalactosylés et les CHO-Lec2 sont déficientes pour le transporteur de CMP-Neu5Ac et elles possèdent des glycanes asialylés. Ces différentes lignées sélectionnées pour leur résistance aux lectines dans les années 80 par P. Stanley constituent des modèles cellulaires pour les études de ces voies de biosynthèses (Stanley, 1983).

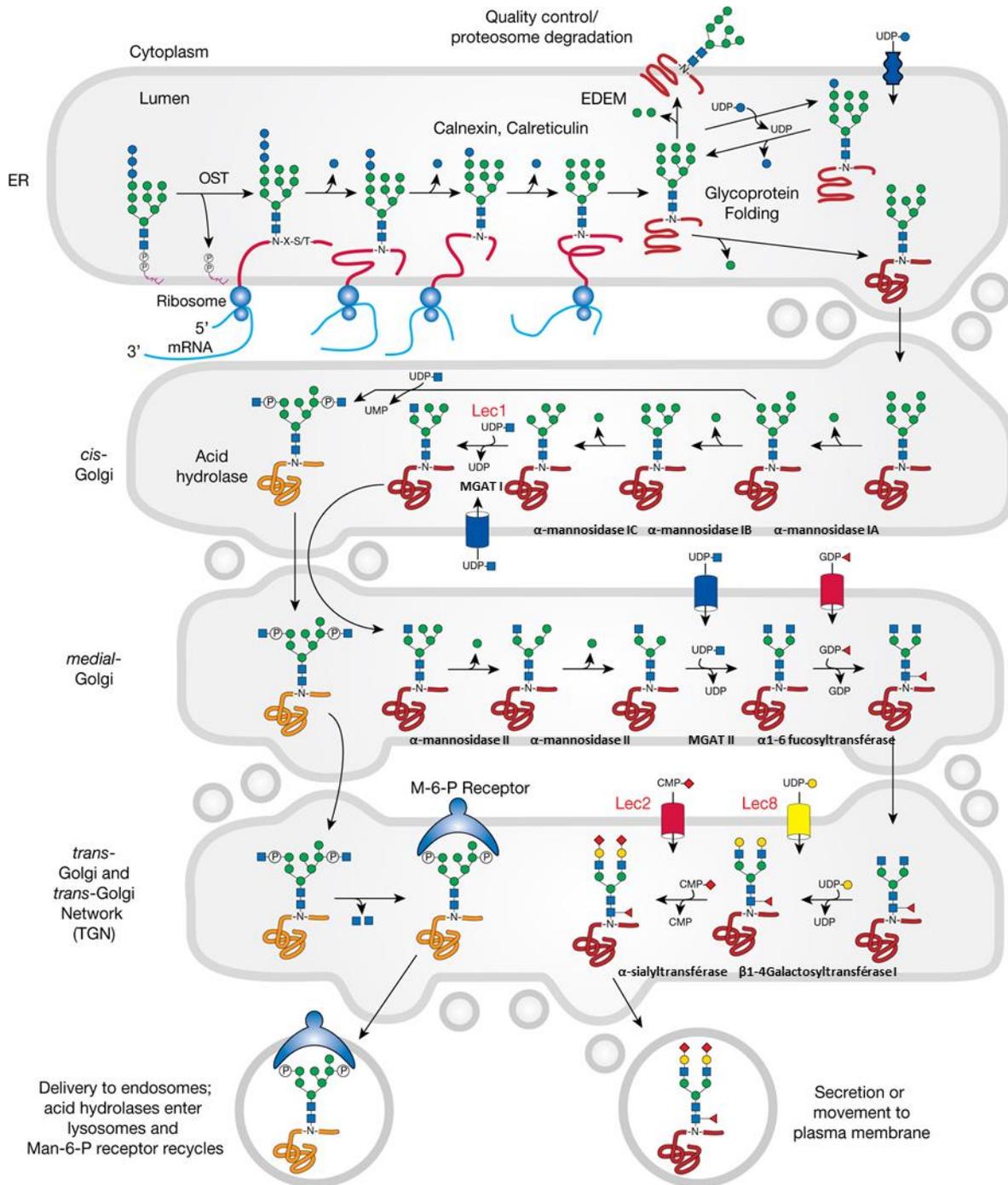


Figure 15. Maturation des N-glycannes au sein de l'appareil de Golgi. Issu d'essentials of Glycobiology volume 3.

2. Biosynthèse des O-glycannes

Il existe plusieurs types d'O-glycosylation dans la cellule animale qui sont caractérisées par une liaison de type O-glycosidique sur le groupement hydroxyle de l'acide aminé. Celui-ci est majoritairement une sérine ou une thréonine et moins fréquemment une tyrosine.

Le premier exemple de *O*-glycosylation est très fréquent et est l'un des plus connus et étudiés. Il s'agit de l'*O*-glycosylation de type mucine qui comprend les glycanes associés à une sérine ou thréonine par un résidu de GalNAc. Les mucines sont des glycoprotéines composées de répétitions de domaine riche en sérine-thréonine-proline, ce qui permet à ces glycoprotéines d'être hautement *O*-glycosylées. On les retrouve principalement au niveau des muqueuses de mammifères où elles ont un rôle de protection (Corfield, 2015). Les monosaccharides qui composent cette classe de glycanne sont le GalNAc, le Gal, le GlcNAc, le Fuc et l'acide sialique. Huit séquences caractéristiques appelés noyaux font partie de cette famille de *O*-glycanne dont la 1 et la 2 sont les plus abondantes chez les mammifères (Figure 16). Ces noyaux peuvent subir une élongation par d'autres glycosyltransférases pour former de nouvelles structures plus complexes. Par exemple le noyau 2 peut être allongé par les glycosyltransférases B3GNT2 et B4GALT1, B4GALT2 et B4GALT3 qui vont transférer respectivement un résidu de GlcNAc et de Gal pour former du kératane sulfate de type II sur le résidu de GlcNAc ou encore il peut être allongé par des α 2,3-sialyltransférases (ST3GAL1 ou ST3GAL2) qui transfèrent de l'acide sialique sur le résidu de galactose (Funderburgh, 2002).

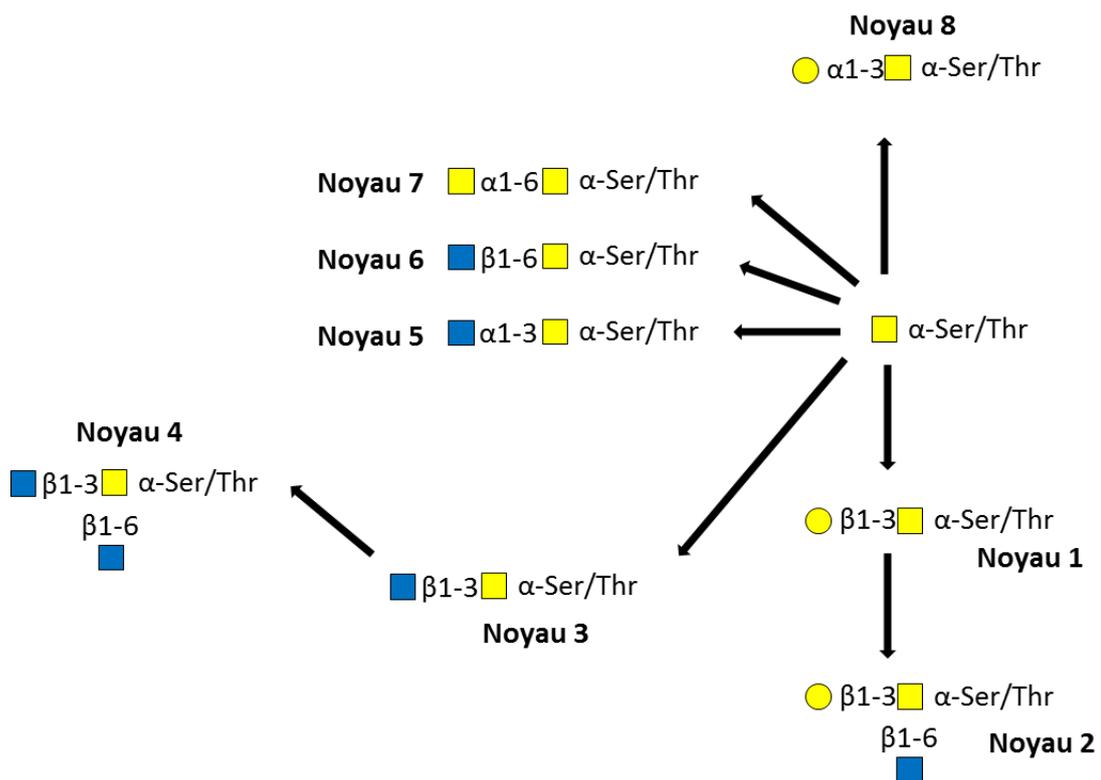


Figure 16. Séquence des différents noyaux retrouvés chez les *O*-glycannes de type mucine.

Un autre type d'*O*-glycanne très connu est celui de type glycosaminoglycane (GAG) trouvé sur les protéoglycanes où un résidu de xylose est associé à une sérine ou une thréonine par une liaison *O*-glycosidique. Les voies de biosynthèse des GAG mettent en jeu l'action séquentielle de

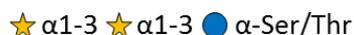


Figure 18. Schéma du *O*-mannosyl glycane de l' α -dystroglycane du muscle squelettique (Corfield and Berry, 2015).

On retrouve également la *O*-fucosylation où un résidu de fucose est ajouté sur une sérine ou thréonine par les enzymes POFUT1 et POFUT2 sur des domaines EGF (Epidermal Growth Factor) ou TSR (Thrombospondin Repeat). La *O*-fucosylation est notamment impliquée dans la différenciation myogénique *via* l'activation de la voie Notch (Der Vartanian et al., 2015). Les domaines EGF peuvent également être porteurs de *O*-glucosyl glycanes. Le glucose est transféré par l'enzyme POGLUT1 ce qui module également l'activité du récepteur membranaire NOTCH (Figure 19).



Tetrasaccharide de *O*-fucose présent sur les domaines EGF de la protéine NOTCH



Triaccharide de *O*-glucose présent sur les domaines EGF de la protéine NOTCH

Figure 19. Schéma de glycanne *O*-fucosylé (en haut) et *O*-glucosylé (en bas) présent sur les domaines EGF de la protéine NOTCH.

La dernière *O*-glycosylation est la *O*-galactosylation qui a lieu uniquement dans le RE sur les protéines porteuses de domaine collagen-like et se réalise sur une hydroxylysine. Des résidus de glucose peuvent ensuite être transférés sur le galactose. La glycosylation du collagène est initiée par l'enzyme COLGALT1 et 2 (Schegg et al., 2009).

3. Biosynthèse des gangliosides

Les glycosphingolipides sont des glycolipides particuliers. Ils sont composés d'un céramide hydrophobe, associé à la membrane plasmique, et d'une partie glycanique hydrophile exposée vers le milieu extracellulaire. On retrouve plusieurs familles de glycosphingolipides (Schnaar and Kinoshita, 2015) :

- Les gangliosides, dont la séquence commune est Gal β 1-4Glc β 1-O-Cer
- Les néolactosides qui ont la séquence Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-O-Cer
- Les lactosides qui ont la séquence Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-O-Cer
- Les globosides qui ont la séquence Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β 1-O-Cer
- Les isoglobosides qui ont la séquence Gal α 1-3Gal β 1-4Glc β 1-O-Cer
- Les mollusides qui ont la séquence GlcNAc β 1-2Man α 1-3Man β 1-4Glc β 1-O-Cer
- Les arthrosides qui ont la séquence GalNAc β 1-4GlcNAc β 1-3Man β 1-4Glc β 1-O-Cer

Les gangliosides sont un type de glycosphingolipides porteurs d'un lactosylcéramide (lactose associé au céramide) qui portent un ou plusieurs résidus d'acide sialique. Les gangliosides sont des composés présents au niveau de la membrane plasmique où ils peuvent interagir avec des phospholipides, du cholestérol et des protéines pour former des microdomaines riches en glycolipides. Leur synthèse est régulée par des glycosyltransférases spécifiques et se fait de manière séquentielle. Elle débute par la formation du lactosylcéramide par la B4GALT6 qui transfère un résidu de galactose sur le glucosylcéramide ce qui initie la formation des gangliosides de la série « 0 ». La série « a » est initiée par la GM3 synthase (ST3GAL5) qui transfère un acide sialique en α 2,3 sur le galactose, puis la GD3 synthase (ST8SIA1) initie la série « b » en transférant un second résidu d'acide sialique en α 2,8 sur le premier acide sialique. Enfin, la GT3 synthase (ST8SIA5) transfère un troisième acide sialique en α 2,8 sur le second pour former les gangliosides de la série « c ». Les gangliosides de ces 4 séries peuvent ensuite être allongés par la GM2/GD2 synthase (B4GALNT1) qui transfère un résidu de GalNAc sur le Galactose puis la GM1a/GD1b synthase (B3GALT4) transfère un autre galactose sur le résidu de GalNAc. La ST3GAL2 ajoute un acide sialique sur le galactose terminal qui peut être allongé par la ST8SIA5 (figure 20). Ces différentes étapes forment différents gangliosides qui sont nommés selon une nomenclature précise. Le G indique qu'il s'agit d'un glycosphingolipide faisant partie de la famille des gangliosides, la seconde lettre indique le nombre d'acide sialique présent (m : mono ; d : di ; t : tri, etc.) et le nombre correspond à l'ordre de migration du ganglioside sur une chromatographie couche mince (TLC) (ex : GM3 > GM2 > GM1) (Schnaar and Kinoshita, 2015).

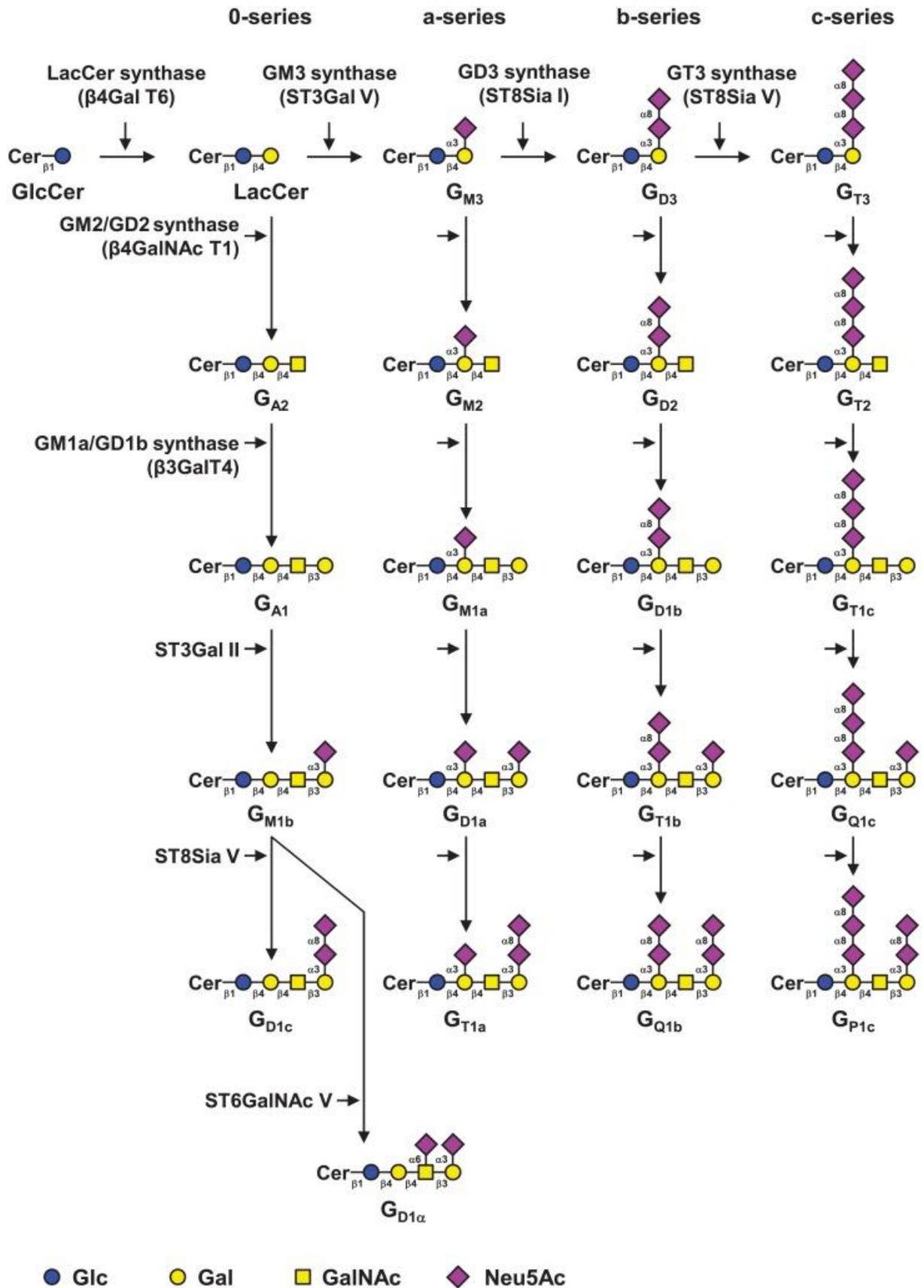


Figure 20. Voie de biosynthèse des gangliosides. La biosynthèse est réalisée sur le glucosylcéramide (Glcβ₁-O-Cer) par l'action successive des B4GALT6, ST3GAL5, ST8SIA1 et ST8SIA5 qui forme les

différentes séries. Leur élongation est ensuite poursuivie par les B4GALNT1, B3GALT4, ST3GAL2, ST8SIA5 et ST6GALNAC5. Issu de Dewald *et al.* (Dewald et al., 2018)

Les gangliosides sont impliqués dans beaucoup de pathologies comme le cancer. Le ganglioside GM3 interagit avec des récepteurs à activité tyrosine kinase et les intégrines pour réguler les voies de transduction impliquées dans l'adhérence cellulaire et la prolifération (Leòn et al., 2006), dans l'athérosclérose où ils activent les plaquettes et favorisant leur adhérence sur les vaisseaux (Prokazova and Bergelson) ou encore dans la maladie d'Alzheimer où le ganglioside de type GM1 peut se complexer avec les peptides β -amyloïdes et s'accumuler (Ariga et al., 2008).

L'ensemble de ces glycoconjugués sialylés contribue au maintien et au bon fonctionnement de la cellule mais également aux interactions de la cellule avec son environnement car l'acide se trouve en position terminale des glycanes. C'est pourquoi une modification de l'expression des sialyltransférases ou des sialoglycoconjugués peut bouleverser le devenir d'une cellule au sein de l'organisme.

IV. Les sialyltransférases

Les sialyltransférases sont des enzymes intervenant dans les dernières étapes de glycosylation. Celles-ci catalysent le transfert d'un résidu d'acide sialique sur le glycanne en cours de maturation au sein du trans-Golgi (Figure 21). Ce sont des enzymes de type Leloir signifiant qu'elles utilisent un monosaccharide activé pour réaliser leur transfert sur le glycanne. Ce sont également des enzymes de la famille CAZy GT29 qui regroupe l'ensemble des sialyltransférases animales et quelques sialyltransférases bactériennes (Petit et al., 2018).

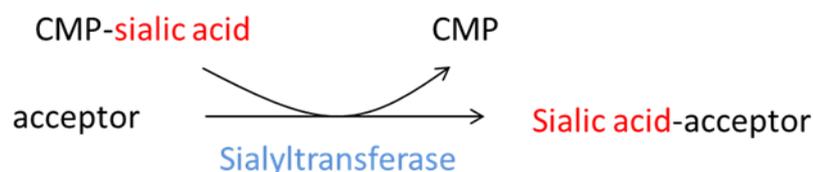


Figure 21. Schéma de la réaction de sialylation. Les sialyltransférases utilisent le CMP-acide sialique comme substrat donneur et catalysent le transfert du monosaccharide sur le substrat accepteur, ce qui libère une molécule de CMP et forme un accepteur sialylé.

Le génome humain exprime 20 gènes distincts de sialyltransférases. Ces enzymes permettent la sialylation de glycoprotéines ou de glycolipides. Chacune d'entre elles possède une spécificité

particulière vis-à-vis d'un type de substrat accepteur. On les classe en 4 familles ST3GAL, ST6GAL, ST8SIA ou ST6GALNAC selon le monosaccharide accepteur et le type de liaison créée. La nomenclature proposée par Tsuji et al. en 1996 reflète cette notion de famille de sialyltransférases (Tsuji et al., 1996).

- ST6GAL : Accepteur galactose avec une liaison en α 2-6
- ST6GALNAC : Accepteur *N*-acetyl-galactosamine avec une liaison en α 2-6
- ST3GAL : Accepteur galactose avec une liaison en α 2-3
- ST8SIA : Accepteur acide sialique avec une liaison en α 2-8

La liaison en alpha signifie que le groupement hydroxyle, porté par le carbone anomérique et impliqué dans la liaison glycosidique, se trouve en dessous du plan formé par le CH₂OH de l'acide sialique. Les liaisons impliquent toujours le carbone 2 anomérique de l'acide sialique et le carbone 3, 6 ou 8 du monosaccharide accepteur. On définit généralement le substrat accepteur comme le monosaccharide ou à plus large échelle, le *N*- ou *O*-glycane ou le glycoconjugué de type protéique et/ou lipidique. Les approches de phylogénie moléculaire développées ces dernières années visant à définir les relations évolutives de ces gènes de sialyltransférase ont amené à définir dans chaque famille plusieurs sous-familles issues d'un gène ancestral commun (Harduin 2005 glycobiology). Ainsi, on dénombre dans le génome humain, 2 sous-familles de *ST6GAL* (*ST6GAL1* et *ST6GAL2*), 6 sous-familles de *ST3GAL*, 6 sous-familles de *ST6GALNAC* et 6 sous-familles de *ST8SIA*.

A. Les gènes de sialyltransférases

Les gènes de sialyltransférases se répartissent sur différents chromosomes dans le génome humain. On les retrouve sur les chromosomes 1, 2, 3, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 16, 17 et 18 (Tableau 2). La distribution des gènes de *ST6GALNAC* est particulière car chacun d'eux va de pair avec un autre gène de *ST6GALNAC* (Tableau 2). C'est le cas pour *ST6GALNAC1* et *ST6GALNAC2*, *ST6GALNAC3* et *ST6GALNAC5* et *ST6GALNAC4* et *ST6GALNAC6*.

Tableau 2. Position des gènes dans le génome humain avec leur nombre d'exons. Au niveau de l'annotation dans le génome, le premier chiffre indique le numéro du chromosome, p ou q indique son bras court (p) et son bras long (q), les derniers chiffres indiquent sa position précise.

Nom du gène	Position dans le génome	Nombre d'exons
<i>ST6GAL1</i>	3q27.3	9
<i>ST6GAL2</i>	2q12.3	13
<i>ST6GALNAC1</i>	17q25.1	12

<i>ST6GALNAC2</i>	17q25.1	11
<i>ST6GALNAC3</i>	1p31.1	12
<i>ST6GALNAC4</i>	9q34.11	8
<i>ST6GALNAC5</i>	1p31.1	6
<i>ST6GALNAC6</i>	9q34.11	10
<i>ST3GAL1</i>	8q24.22	11
<i>ST3GAL2</i>	16q22.1	16
<i>ST3GAL3</i>	1p34.1	25
<i>ST3GAL4</i>	11q24.2	17
<i>ST3GAL5</i>	2p11.2	17
<i>ST3GAL6</i>	3q12.1	16
<i>ST8SIA1</i>	12p12.1	5
<i>ST8SIA2</i>	15q26.1	7
<i>ST8SIA3</i>	18q21.31	4
<i>ST8SIA4</i>	5q21.1	6
<i>ST8SIA5</i>	18q21.1	9
<i>ST8SIA6</i>	10p12.33	12

Les gènes de sialyltransférases sont des gènes polyexoniques et la répartition des jonctions exon/intron est similaire dans chaque famille de sialyltransférase, ce qui dénote encore de l'origine commune de ces gènes dans une même famille (Figure 22). Cette répartition et cette organisation génique se retrouvent également chez les sous-familles de sialyltransférases de vertébrés car les enzymes du poisson *danio rerio* adoptent la même organisation génomique (Harduin-Lepers et al., 2005). Cette organisation similaire des gènes de sialyltransférases dans chaque famille est aussi un critère dans l'identification et l'annotation des sialyltransférases dans les génomes de vertébrés (Harduin 2005).

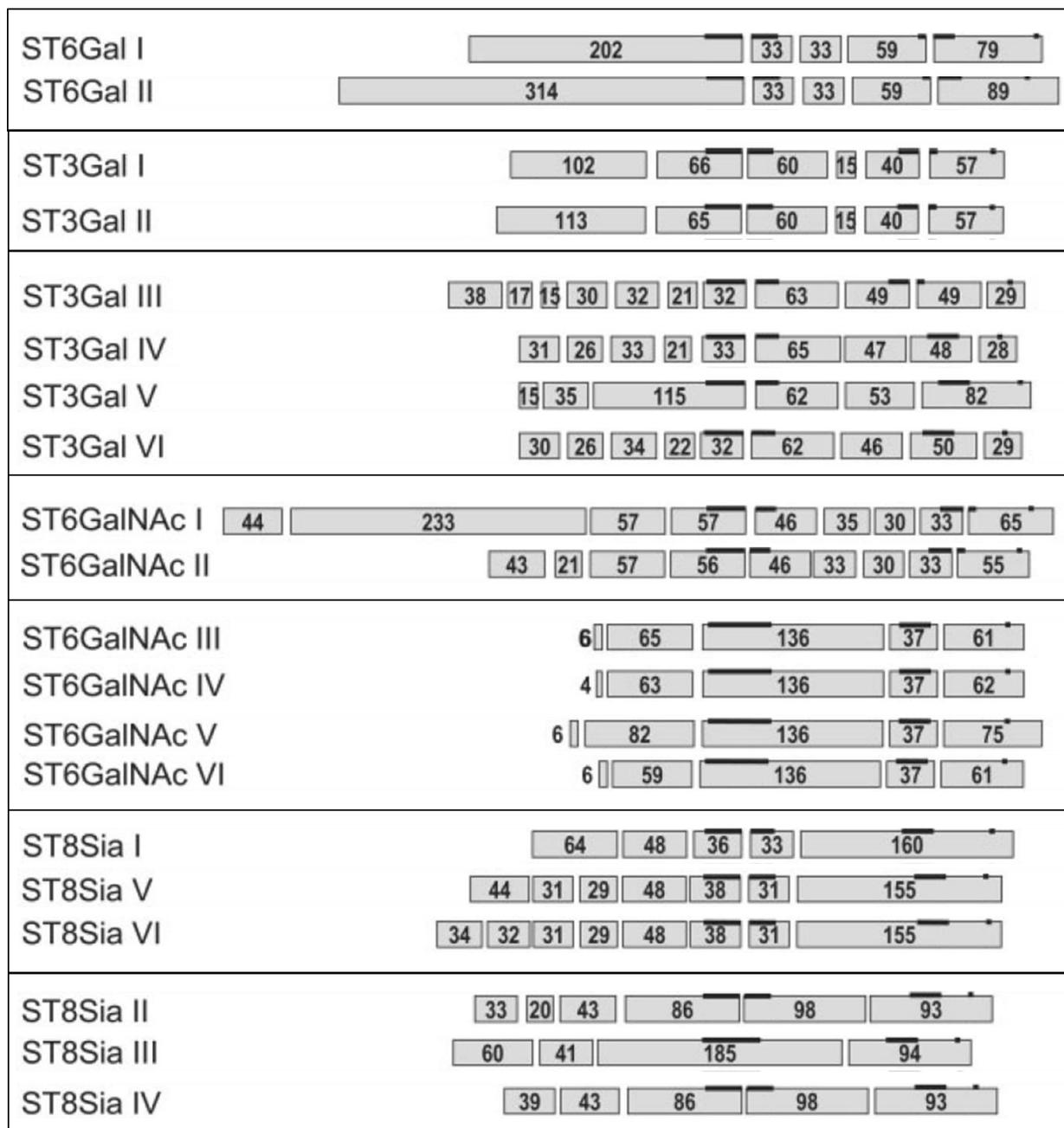


Figure 22. Schéma montrant l'organisation génique des gènes humains de sialyltransférases. Les exons codants sont représentés par des rectangles de taille relative avec le nombre d'acides aminés indiqué à l'intérieur. Les sous familles sont indiquées sur le côté gauche. Une organisation génique similaire a été identifiée pour *ST6GAL1* et 2, pour *ST3GAL1* et 2, pour *ST3GAL3*, 4, 5 et 6, pour *ST6GALNAC1* et 2, pour *ST6GALNAC3*, 4, 5 et 6, pour *ST8SIA1*, 5 et 6 et pour *ST8SIA2*, 3 et 4. Tiré de (Harduin-Lepers et al., 2005).

B. Régulation transcriptionnelle

Il existe une corrélation forte entre la quantité d'ARNm exprimé au sein de la cellule et l'activité enzymatique au sein de lysat cellulaire. Cette corrélation suggère que la quantité d'acide sialique à la membrane plasmique dépend de l'expression du gène et de sa régulation transcriptionnelle (Comelli et al., 2006; Nairn et al., 2008). Les facteurs de transcription impliqués dans la régulation transcriptionnelle des gènes de sialyltransférases sont résumés dans le tableau 3. Ces facteurs de transcription sont activés dans certaines pathologies ou sous l'influence de molécules, naturelles ou synthétiques, capables de moduler leur état d'activation. Par exemple, dans le glioblastome, l'expression augmentée de *ST3GAL1* confère aux cellules cancéreuses une augmentation de leurs propriétés invasives. Cette augmentation est corrélée avec l'activation de la voie de transcription induite par le TGF- β , une molécule produite principalement lors de conditions inflammatoires (Chong et al., 2015). De même, l'Il-6, autre protéine impliquée dans les états d'inflammation, est capable d'augmenter l'expression transcriptionnelle de *ST6GAL2* dans des explants bronchiques humains, cette augmentation est corrélée avec le développement de la mucoviscidose (Groux-Degroote et al., 2008). Cependant, l'augmentation de l'expression des gènes de sialyltransférases n'est pas forcément corrélées avec un mauvais pronostic et cette régulation peut être exploitée dans certains traitements. C'est le cas du physcion, un dérivé de l'antraquinone retrouvé dans la rhubarbe, qui possède des effets anti-cancérigènes. Cette molécule augmente l'expression de *ST8SIA6* via la voie ERK et p38/MAPK dans des cellules de neuroblastome réduisant la viabilité cellulaire (Yoon et al., 2016). Cependant, l'épigénétique module également la transcription et celle-ci doit être prise en compte dans l'expression de gènes.

Tableau 3. Facteurs de transcription impliqués dans la régulation transcriptionnelle des gènes de sialyltransférases.

Nom du gène	Facteur de transcription	Références
<i>ST3GAL1</i>	Sp-1, USF, NF-kB	Higai et al., 2006; Taniguchi et al., 2001a
<i>ST3GAL2</i>	MZF1, Sp-1, GATA-1, AML-1a, c-EBPb, USF, c-Myb	Taniguchi et al., 2001a)
<i>ST3GAL3</i>	Sp-1	Taniguchi et al., 2003a
<i>ST3GAL4</i>	AP-2, c-ETS	Taniguchi et al., 2003b
<i>ST3GAL6</i>	S8, HNF-3b, CdxA, C/EBP, p300, GATA-1, AML-1a, SRY	Taniguchi et al., 2001b
<i>ST6GAL1</i>	HNF-1, DBP, Sp-1, Oct-1	Svensson, 1992; Xu et al., 2003

<i>ST6GAL2</i>	NF-kB, NRSF, Sox5, Pura, Olf1	Lehoux et al., 2010
<i>ST6GALNAC1</i>	c-Myb, c-Myc/Max, c-Ets	Kurosawa et al., 2000
<i>ST6GALNAC3</i>	Sp-1	Takashima et al., 1999
<i>ST6GALNAC4</i>	Sp1	Takashima et al., 1999
<i>ST8SIA1</i>	NF-kB	Bobowski et al., 2013
<i>st8sia2</i>	Sp-1	Yoshida et al., 1996a
<i>ST8SIA3</i>	AP-2	Yoshida et al., 1996b

C. Régulation de l'expression des gènes de sialyltransférase par épigénétique

L'épigénétique est un domaine de la biologie étudiant les phénomènes de régulation transcriptionnelle de certains gènes de manière réversible, adaptative et transmissible à la descendance sans modifier la séquence en désoxynucléotides. Il est fort probable que ce mécanisme touche tous les glyco-gènes (résumé dans l'article de G.Lauc et al.(Lauc et al., 2014)). En ce qui concerne la *ST6GAL1*, le gène présent dans les tumeurs de la vessie est hyperméthylé, ce qui entraîne une diminution d'expression du gène qui est corrélée avec la progression tumorale (Antony et al., 2014). Une augmentation forcée de l'expression du gène *ST6GAL1* diminue la tumorigénicité de cellules cancéreuses du glioblastome (Yamamoto et al., 2001). De même pour *ST3GAL6*, le gène est hyperméthylé causant une baisse de son expression dans les cancers gastriques (Kawamura et al., 2008). Cependant très peu de choses sont connues concernant les mécanismes moléculaires intervenant dans la méthylation des gènes de sialyltransférases.

D. Régulation post-transcriptionnelle par les miRNAs (micro-ARNs)

Les miRNAs sont des acides nucléiques non-codants transcrits par la cellule dont le but premier est de se lier à une séquence d'ARN (type ARNm) afin de former un ARN double-brin reconnu par le complexe DICER et clivé. Ce mécanisme permet ainsi d'inhiber l'expression protéique de certains gènes et de réguler, à plus grande échelle, certaines voies cellulaires. Au niveau des sialyltransférases, cet effet a été démontré, notamment au niveau des processus cancéreux (Tableau 4). Il a été démontré que des miRNAs ciblent les ARNm des gènes de *ST3GAL1*, *ST3GAL3* et *ST3GAL4* favorisant les propriétés invasives de cellules cancéreuses cervicales ainsi qu'une faible différenciation et une invasion des cancers vasculaires et lymphatiques. Ces effets sont corrélés avec

une augmentation d'expression en ARNm de *ST6GAL1* (Wang et al., 2001). Cependant, comme les miRNAs ciblent une séquence nucléotidique qui peut être présentes sur plusieurs transcrits, il est difficile d'étudier spécifiquement l'effet d'une seule sialyltransférase dont l'expression est inhibé par un miRNA sur le processus de cancérogène.

Tableau 4. miRNAs inhibant directement ou indirectement l'expression des sialyltransférases.

MiRNA	ARNm cible	Effets	Référence
miR-7401-5p	<i>ST3GAL1</i>	Réduit la résistance de cellules de leucémie myéloïde chronique à des agents chimiothérapeutiques	(Li et al., 2016)
miR-26/26b	<i>ST8SIA4</i>	Cible l'ARNm au niveau de sa partie 3'-UTR permettant de réduire la progression cancéreuse en diminuant la division et l'invasion de cellules MDA-MB-231	(Ma et al., 2016)
miR-4299	<i>ST6GALNAC4</i>	Diminue les propriétés invasives et tumorigènes de cellules de carcinomes folliculaires de la thyroïde	(Miao et al., 2016)
miR-26a, miR-5481, miR-34a	<i>ST3GAL5</i>	Limite la progression de carcinome hépatocellulaires	(Cai et al., 2017)
miR-135b, miR-182	Inconnu	Régule négativement <i>ST6GALNAC2</i> via la voie PI3K/Akt	(Liu et al., 2017)
miR-33a, let-7e	<i>ST8SIA1</i>	Supprime chimiorésistance, prolifération, invasion et angiogénèse	(Shan et al., 2017)
miR-9	<i>ST6GAL1</i>	Réduit le potentiel métastatique des cellules	(Han et al., 2018)

E. Structure des sialyltransférases

Les sialyltransférases sont des protéines membranaires de type II qui possèdent , de ce fait, une courte queue cytoplasmique, un unique domaine transmembranaire localisé dans la membrane de l'appareil de Golgi, une région tige et un domaine catalytique orienté vers la lumière de l'appareil de Golgi (Colley and Paulson, 1989; Harrus et al., 2018) (Figure 23).

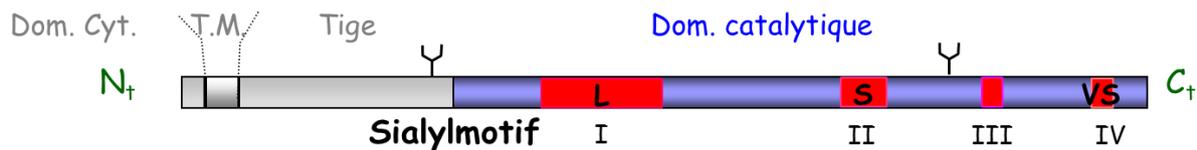


Figure 23. Représentation des différents domaines des sialyltransférases. Les sialyltransférases faisant partie de la famille CAZy GT29 possèdent un domaine cytosolique coté *N*-ter puis un domaine transmembranaire, une région tige et un domaine catalytique. Dans ce dernier domaine, on trouve des motifs peptidiques conservés nommés sialylmotif L, S, III et VS.

La séquence en acides aminés est à la base de toutes les protéines et leur confère certaines propriétés qu'il est possible de prédire bio-informatiquement. Au niveau des sialyltransférases, des alignements multiples de séquence en acides aminés de différentes espèces animales ont pu mettre en lumière la présence de motifs conservés au cours de l'évolution appelés sialylmotifs situés dans le domaine catalytique. Au nombre de 4, ils sont nommés sialylmotif L (pour Large), S (Small), III et VS (Very Small) et on les retrouve chez toutes les sialyltransférases de la famille CAZy GT29. Des expériences de mutagenèse dirigée ont montré que le sialylmotif L est impliqué dans les interactions avec le substrat donneur (Datta and Paulson, 1995) et que le motif S interagit avec le substrat accepteur (Datta et al., 1998) (Figure 24). Concernant les motifs III et VS, tous deux sont impliqués dans l'activité catalytique de l'enzyme (Jeanneau et al., 2004).

Le sialylmotif L possède 48-49 acides aminés dont 5 sont strictement conservés au cours de l'évolution moléculaire des sialyltransférases (Livingston and Paulson, 1993). On retrouve dans ce motif des cystéines qui sont impliquées dans la formation de ponts disulfure intramoléculaires (Datta et al., 2001). Le sialylmotif S possède 23 acides aminés dont une glycine et cystéine très conservées (Datta and Paulson, 1997). Le sialylmotif III comporte 4 acides aminés dont une histidine et une tyrosine très conservés (Jeanneau et al., 2004). Enfin, le sialylmotif VS possède 4 acides aminés avec un acide glutamique et une histidine également très conservés (Geremia et al., 1997). Par ailleurs, le résidu d'histidine dans le motif III interagit directement avec le groupement phosphate du substrat donneur, quant au sialylmotif S, il est positionné de façon proche avec le substrat donneur chargé négativement ce qui confirme les expériences de mutagenèse dirigée menée par Datta *et al.* montrant que le résidu d'histidine est essentiel à l'activité enzymatique (Datta and Paulson, 1997).

On retrouve également des motifs spécifiques et conservés au sein de chaque famille de sialyltransférases (ST6GAL, ST3GAL, ST6GALNAC et ST8SIA) que l'on appelle motifs de famille (Harduin-Lepers, 2013; Patel and Balaji, 2006). La connaissance de ces motifs permet d'associer une

sialyltransférase à une famille déjà connue. Au nombre de 5, on les appelle motifs de famille a, b, c, d et e (Figure 23).

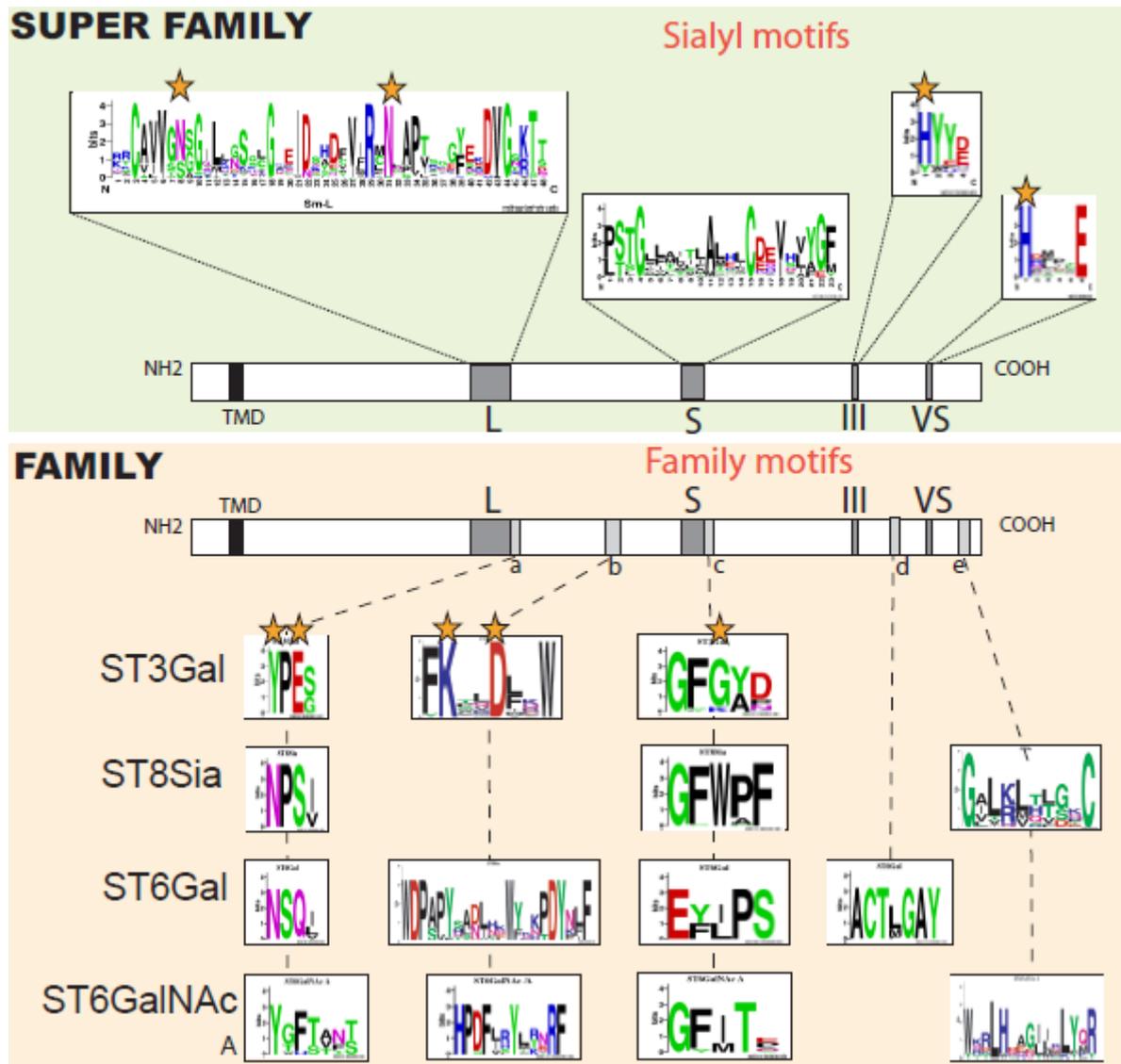


Figure 24. Figure illustrant 2 niveaux de conservation des acides aminés. La représentation du haut montre le premier niveau de conservation des acides aminés représentés par les rectangles de sialylmotifs L, S, III et VS au niveau de la représentation schématique de la sialyltransférase. Ces sialylmotifs caractérisent les motifs de super-famille. Le logo représente la fréquence d'apparition d'acides aminés dans ces 4 motifs réalisés sur 126 séquences de sialyltransférase de vertébrés. Les étoiles indiquent les acides aminés impliqués dans la liaison aux substrats comme démontré dans la cristallographie de la ST3GAL1 porcine (Rao et al., 2009). La représentation du bas montre les logos des motifs de famille avec la fréquence d'apparition d'acides aminés caractérisant chaque famille de sialyltransférase : ST3GAL avec 42 séquences de vertébrés, ST8SIA avec 37 séquences de vertébrés, ST6GAL avec 13 séquences de vertébrés et ST6GALNAC avec 23 séquences de vertébrés. Les motifs de famille a, b, c, d et e sont positionnés de façon relative aux sialylmotifs précédemment décrits. Dans les logos, la couleur de l'acide aminé indique sa propriété chimique ; les polaires sont verts (G, C, S, T, Y), les basiques sont bleus (K, R, H), les acides sont rouges (D, E), les hydrophobes sont noirs (A, V, L, I, P, W, F, M) et les neutres sont roses (N, Q). Tiré de (Harduin-Lepers, 2013).

Les enzymes ST6GAL1 et ST3GAL1 font partie des sialyltransférases les plus étudiées dans la littérature et servent souvent de modèle dans les études impliquant la sialylation. ST6GAL1 transfère un résidu d'acide sialique sur un résidu de galactose, porté par un *N*-glycane d'une glycoprotéine, en créant une liaison en α 2-6. Quant à ST3GAL1, elle transfère un résidu d'acide sialique sur un résidu de galactose, porté par un *O*-glycane d'une glycoprotéine. Des expériences de mutagenèse dirigée ont été réalisées afin d'identifier l'impact des acides aminés au sein de ces motifs sur l'activité de l'enzyme. Ces études de mutagenèse dirigée sur les ST6GAL1 et ST3GAL1 humaines et d'autres encore sur les enzymes de rat et de souris indiquent clairement l'importance de ces motifs conservés pour l'activité de l'enzyme (Figure 25 et 26)(Datta and Paulson, 1995; Datta et al., 1998).

*Homo sapiens*_ST6Gal1

A

MIHTNLKKKFSCCVLFVLLFAVICVWKEKKKGSYYDSFKLQTKFQVLKSLGKLAMGSDSQS
VSSSTQDPHRGRQTLGSLRGLAKAKPEASFQVWNKDSSSKNLI PRLQKIWKNYLSMNKYKV
SYKGGPGGIKFSAEALRCHLRDHVNVSMVEVTDFFNTSEWEGYLPKESIRTKAGPWGRCAV
VSSAGSLKSSQLGREIDDHDAVLRFNAGAPTANFQQDVGTKTTIRLMNSQLVTTTEKRFLKDSL
YNEGILIVWDPSVYHSDIPKQYQNP^{D274}YNFFNNYKTYRKLHPNQPFYIILKPQMPWELWDIL
QEISPEEIQPNP^{PSSGM325LGI328}IIMM^{TLCDQVDIYE342F343}LPSKRKTDV^{Y354Y355}YQK
FFDS^{ACTMGAY369HPLL}^{Y374E}KNLVKHLNQGTDEDIYLLGKATLPGFRTIHC

B

Identification mutation	Effets	Réfs	Sialylmotif impacté
M325I-hST6GAL1	Faible activité (40-60%)	(Laroy et al., 2001)	S
I328N-hST6GAL1	Faible activité (5-20%)	(Laroy et al., 2001)	S
E342G-hST6GAL1	Pas d'activité	(Laroy et al., 2001)	S
F343S-hST6GAL1	Pas d'activité	(Laroy et al., 2001)	S
Y354D-hST6GAL1	Faible activité (5-20%)	(Laroy et al., 2001)	III
Y355N-hST6GAL1	Faible activité (20-40%)	(Laroy et al., 2001)	III
Y374N-hST6GAL1	Faible activité (20-40%)	(Laroy et al., 2001)	VS

C

Identification mutation	Effets	Réfs	Motif de famille impacté
D274Y-hST6GAL1	Pas d'activité (<5%)	(Laroy et al., 2001)	b
F343S-hST6GAL1	Pas d'activité	(Laroy et al., 2001)	c
K347E-hST6GAL1	Pas d'activité	(Laroy et al., 2001)	c
Y369N-hST6GAL1	Activité correcte (>60%)	(Laroy et al., 2001)	d

Figure 25. Effets de mutations dans les sialylmotifs et les motifs de famille sur la ST6GAL1 humaine.
A) Séquence en acides aminés de la ST6GAL1 humaine avec identification des motifs de famille (en bleu), des motifs de sous-famille (en rose) ainsi que la position des acides aminés mutés représentés en B et C. B) Tableau récapitulatif des mutations réalisées dans les différents sialylmotifs. C) Tableau récapitulatif des mutations réalisées dans les différents motifs de famille.

*Homo sapiens*_ST3gal1

A

MVTLRKRTLKVVTFVLVLFIFLTSFFLNYSHTMVATTWFPKQMVLELSENLKRLIKHRPCTCTHCIGQRKLSA
 WFDERFNQTMQPLLLTAQNALLEDDTYRWLRLQREKKPNNLNDTIKELFRVVPGNVDPMLEKRSVGCRRCAV
 VGNSGNLRESSYGPEIDSHDFVLRMNKAPTAGFEADVGTKTTHHLVYPESFRELGDNVSMILVPFKTIDLEW
 VVSAITTGTTISHTYI PVPKIRVKQDKILIIYHPAFIKYVFDNWLQHGGRYPSTGILSVIFSMHVCDEVLDLYG
 FGADSKGNWH^{H299}^{Y300}^{W301}^{E302}NNPSAGAFRKTGV^{H316}^{DADF}^{E321}SNVTATLASINKIRIFKGR

B

Identification mutation	Effets	Réfs	Sialylmotif impacté
H299A- Δ56hST3GAL1	Pas d'activité	(Jeanneau et al., 2004)	III
H299Y- Δ56hST3GAL1	Pas/peu d'activité	(Jeanneau et al., 2004)	III
Y300F-Δ56hST3GAL1	Km augmenté (8,5=>13)	(Jeanneau et al., 2004)	III
Y300A-Δ56hST3GAL1	Pas d'activité	(Jeanneau et al., 2004)	III
W301F- Δ56hST3GAL1	Km inchangé (8,5=>8)	(Jeanneau et al., 2004)	III
W301A- Δ56hST3GAL1	Pas/peu d'activité	(Jeanneau et al., 2004)	III
E302Q- Δ56hST3GAL1	Conservation d'activité	(Jeanneau et al., 2004)	III
E321Q- Δ56hST3GAL1	Km augmenté (8,5=>20)	(Jeanneau et al., 2004)	VS

Figure 26. Effets de mutations dans les sialylmotifs de la ST3GAL1 humaine. A) Séquence en acides aminés de la ST3GAL1 humaine avec identification des motifs de famille (en bleu), des motifs de sous-famille (en rose) ainsi que la position des acides aminés mutés représentés en B. B) Tableau récapitulatif des mutations réalisées dans différents sialylmotifs.

Des analyses d'alignement multiples des sialyltransférases orthologues de vertébrés prises deux par deux ont montré qu'il existe un troisième niveau d'acides aminés conservés spécifiques de chaque sous famille de sialyltransférases (ST6GAL1, ST3GAL2, etc.) (Harduin et al. 2005). Ces résidus sont supposés être impliqués dans la spécificité de substrats.

Il existe également d'autres motifs non conservés qui correspondent à des positions en acides aminés qui détermineraient la spécificité de l'enzyme. Ces motifs, nommés SDP (Specificity Determining Position), seraient impliqués dans une reconnaissance fine des différents substrats au

sein des sous-familles de différentes espèces. L'identification de ces SDP dans une famille de sialyltransférases est donc particulièrement importante pour comprendre la divergence fonctionnelle de ces enzymes au cours de l'évolution. Ainsi, une étude récente de bioinformatique visant à déterminer quels étaient ces SDP dans la famille des ST6GAL (ST6GAL1 et ST6GAL2) a conduit à l'identification d'une tyrosine en position 122 de la ST6GAL1 humaine et présente dans toutes les ST6GAL1 de vertébrés et d'une histidine présente dans toutes les ST6GAL2 de vertébrés à cette position (Teppa et al., 2016). Des études structurales ont montré que la Y122 est impliquée dans la reconnaissance du motif accepteur LacNAc (Gal β 1-4GlcNAc) (Kuhn et al., 2013). Par ailleurs des analyses de mutation *in silico* de Y122H et de modélisation de la GalNAc du motif LacDiNAc (GalNAc β 1-4GlcNAc) reconnu et utilisé par la ST6GAL2 confirment ces prédictions de déterminant de spécificité de ces acides aminés (Teppa et al., 2016), ce qui reste à montrer expérimentalement (Figure 27).

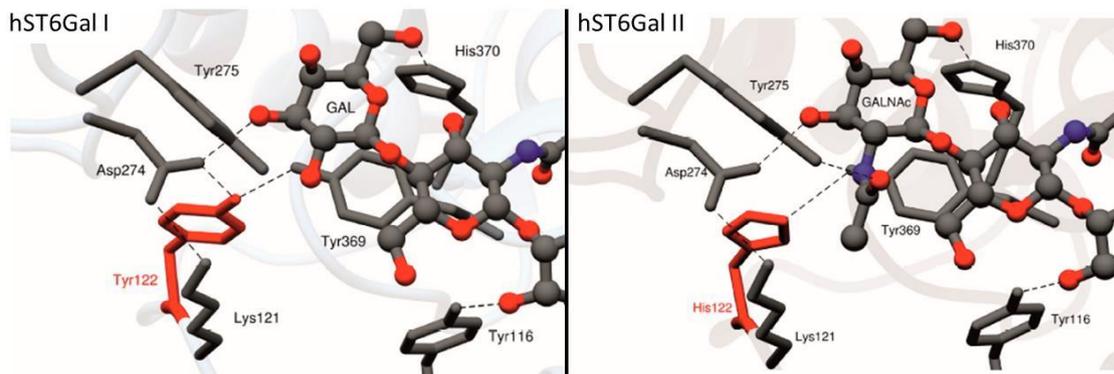


Figure 27. Données cristallographiques de la ST6GAL1 et ST6GAL2 humaine avec mise en évidence du SDP en position 122 et son importance dans la reconnaissance du monosaccharide accepteur. La ST6GAL1 humaine (à gauche) porte une tyrosine en position 122 et reconnaît le galactose. La ST6GAL2 humaine (à droite) porte une histidine en position 122 et reconnaît le GalNAc.

Il a également été prouvé que des acides aminés hors des séquences conservées sont importants pour la reconnaissance des substrats. Le changement d'un seul acide aminé peut grandement moduler le destin de l'enzyme. Chez la ST6GAL1 de rat il existe une isoforme naturellement mutée au niveau du domaine catalytique, sur le 123^{ème} acide aminé. Cette isoforme possède une tyrosine au lieu d'une cystéine et est transitoirement localisée dans l'appareil de Golgi puis sécrétée alors que la présence de la cystéine sur cette position entraîne une enzyme stablement localisée dans l'appareil de Golgi et n'est pas clivée ou sécrétée. De plus cette dernière isoforme est plus encline à former des oligomères (Fenteany and Colley, 2005).

Parmi les sialyltransférases eucaryotes cristallisées, on retrouve la ST6GAL1 humaine (PDB : 4JS1) et de rat (PDB : 4MPS), la ST3GAL1 de porc (*sus scrofa*) (PDB : 2WML), la ST8SIA3 humaine (PDB : 5BO6) et la ST6GALNAC2 humaine (PDB : 6APJ). Les sialyltransférases font partie des variants de repliement GT-A, c'est-à-dire qu'elles adoptent une topologie sous la forme 612345, de plus elles n'ont pas le motif DxD (Asp-X-Asp), et ne nécessite pas la présence de cations divalents pour être actives (Harrus et al., 2018). Enfin, l'analyse des données cristallographiques révèle qu'aucun cation divalent n'a été cristallisé avec l'une de ces sialyltransférases ce qui tend à confirmer qu'elles n'ont pas besoin de cation comme co-facteur.

F. Les modifications post-traductionnelles des sialyltransférases

Les sialyltransférases sont elles-mêmes des glycoprotéines dont la glycosylation est importante pour l'activité de l'enzyme. Certaines asparagines sont conservées au cours de l'évolution. C'est le cas de l'asparagine 211 chez ST3GAL2 qui est conservée chez les mammifères, les oiseaux et les poissons et est impliquée dans le trafic intracellulaire et l'activité de l'enzyme (Ruggiero et al., 2015). Pour ST6GAL1, l'absence de galactose et d'acide sialique sur ses *N*-glycannes a peu d'effet sur son activité enzymatique mais une absence complète de *N*-glycane entraîne une enzyme inactive *in vitro* (Fast, 1990). Effectivement, chez la ST6GAL1 de rat, les auteurs ont muté les asparagines 146 et/ou 158 afin d'empêcher la *N*-glycosylation de cette enzyme. Toutes les isoformes de l'enzyme se retrouvent dans l'appareil de Golgi mais un marquage à la SNA (*sambucus nigra* agglutinin), une lectine qui reconnaît les acides sialiques liés en α 2-6, montre une activité *in cellulo* un peu plus faible pour la double mutation (Chen and Colley, 2000). De façon intéressante, des essais enzymatiques *in vitro* de Chen et al. ont montré que le mutant N146S de la ST6GAL1 de rat est actif à 16% alors que le mutant N158Q et le double mutant sont complètement inactifs. Les auteurs ont également procédé à la production de formes tronquées du domaine transmembranaire afin de les rendre soluble dans le milieu de culture. Ces formes tronquées ne sont ni sécrétées ni actives en l'absence de *N*-glycannes, cependant ils n'ont pas testé avec un seul de ces 2 *N*-glycannes (Chen and Colley, 2000). Ces résultats sont contradictoires avec les formes pleine taille dans le sens où celles-ci n'ont pas besoin de *N*-glycane pour être présentes dans l'appareil de Golgi alors que les formes tronquées ne sont pas sécrétées. Les auteurs proposent que la présence de *N*-glycannes est requise pour atteindre les compartiments post-golgien où se fait le clivage pour libérer l'enzyme de la membrane golgienne.

Les sialyltransférases sont également phosphorylées afin de réguler leur activité enzymatique. L'étude de Gu *et al.* a montré qu'en incubant la ST3GAL2, la ST3GAL4, la ST8SIA1 et la

ST8SIA5 avec la PKC et de l'ATP, l'activité *in vitro* de ces enzymes étaient diminuées (Gu et al., 2002). Par ailleurs, une activation de l'activité de la ST3GAL2 a également été observée en utilisant des microsomes de cellules NG108-15 traitées avec une phosphatase ce qui tend à démontrer que les sialyltransférases sont phosphorylées *in cellulo* (Bieberich et al., 1998).

G. Interactions avec d'autres glycosyltransférases

Plusieurs études tendent à démontrer que les glycosyltransférases, et notamment les sialyltransférases, agissent en oligomères et que cette interaction augmente leur activité enzymatique.

La structure 3D de ST8SIA3 humaine révèle que cette enzyme doit se dimériser pour être active, cela dans le but de créer une poche chargée positivement afin de contrer la charge négative portée par l'acide sialique (Harrus et al., 2018). Il a été montré qu'au sein du *trans*-Golgi, ST6GAL1 est capable de former des homo-oligomères grâce à des ponts disulfures car réaliser un Western-blot avec un lysat cellulaire de cellules CHO transfectées avec cette enzyme dans des conditions dénaturantes suppriment l'apparition de ces dimères (Qian et al., 2001). Elle est également capable de former des hétéro-oligomères avec la B4GALT1, l'enzyme qui catalyse le transfert de galactose servant de substrat accepteur à cette sialyltransférase. Toutefois, elle ne co-localise pas avec la MGAT2 contrairement à la B4GALT1 qui utilise son substrat pour transférer le galactose (Hassinen et al., 2010). Cela laisse à penser qu'une coopération enzymatique se forme dans l'appareil de Golgi où l'enzyme qui transfère un monosaccharide s'associe avec celle qui va utiliser son substrat. Cependant, de manière intéressante, une fois sécrétée, ST6GAL1 est sous forme monomérique, ce qui augmente son affinité pour le CMP-Neu5Ac (Qian et al., 2001).

Les cystéines sont également importantes dans la formation de dimères entre glycosyltransférases, notamment par la formation de pont disulfure. Des expériences de mutagénèse dirigée suivi d'une analyse en Western-blot en condition non dénaturante ont montré que les cystéines 181 et 332 entraînent une absence de dimères. Cependant, ces cystéines 181 et 332 de ST6GAL1 forment des ponts disulfures intramoléculaire comme indiqué dans la cristallisation de l'enzyme et sont essentielles à l'activité enzymatique (Kuhn et al., 2013). Une mutation entraîne donc une enzyme mal conformée qui n'atteint pas l'appareil de Golgi, d'où l'absence de dimères lorsque ces cystéines sont absentes. Cependant, d'autres résidus de cystéines sont impliqués dans la formation de dimères, c'est le cas de la cystéine 24 localisé dans le domaine transmembranaire. Des expériences de mutagénèse dirigée, de Western-blot en condition non dénaturante et d'immunofluorescence ont mis en évidence que cet acide aminé était important dans la formation de dimères au sein de l'appareil de Golgi (Figure 28) (Qian et al., 2001).

Rattus norvegicus_ST6Gal1

A

MIHTNLKKKFSLFILVLLFAVIC₂₄VWKKGSDYEALTLQAKEFQMPKSQEKVAMGSASQVVFNSNKQDPK
 EDIPILSYHRVTAKVKPQPSFQVWDKDYSTYSKLNPRLKLIWRNYLNMNKYKVS_{Y/c123}KGPGPGVKFSVEA
 LRC₁₃₉HLRDHVNVSMIEATDFPFNTTEWEGYLPKENFRTKVGWPQRC₁₈₁AVVSSAGSLKNSQLGREIDNH
 DAVLRFNGAPTDFNFQQDVGSKTTIRLMNSQLVTTEKRFLKDSLYTEGILIVWDPSVYHADIPKWKYQKPDY
 NFFETYKSYRRLNPSQPFYILKPQMPWELWDIIQEISADLIQPNPSSGMLGIIIMMTLC₃₃₂DQVDIYEF
 LPSKRKTDVC₃₅₀YYHQKFFDSAC₃₆₁TMGAYDPLLEKNMVKHLNEGTDDEDIYLF GKATLSGFRNIRC₄₀₃

B

	C ₂₄ A	C ₁₃₉ S	C ₁₈₁ A	C ₃₃₂ A	C ₃₅₀ S	C ₃₆₁ S	C ₄₀₃ S
Localisation	Golgi	Golgi	RE	RE	Golgi	Golgi	Golgi
Dimérisation	Non	Augmenté	Non déterminé	Non déterminé	Oui	Oui	Oui
Activité catalytique	Oui	Oui	Minimale	Non	Non	Non	Oui
Clivage et sécrétion	Oui	Diminuée	Non	Non	Oui	Oui	Diminuée

Figure 28. Implications des cystéines dans les propriétés enzymatiques de ST6GAL1 de rat (d'après Qian et al., 2001). A) Séquence en acides aminés de la ST6GAL1 de rat avec représentation des sialylmotifs (en bleu) et des motifs de famille (en rose) et l'identification des cystéines mutées. B) Effet de la mutation de ces cystéines sur la localisation, la dimérisation, l'activité catalytique et le clivage et la sécrétion de l'enzyme ST6GAL1.

Certaines glycosyltransférases impliquées dans la biosynthèse des gangliosides, soit la ST3GAL2, la ST3GAL5, la ST8SIA1 et la B4GALNACT1 sont S-acylées (également appelé palmitoylation) au niveau de la queue cytosolique. ST3GAL2 possède une cystéine conservée dans le domaine transmembranaire en position 3 chez l'Homme qui peut être S-acylée (Ramirez et al., 2017). Les auteurs ont démontré, par des expériences d'inhibition de la palmitoylation grâce à l'hydroxylamine que, lorsque cet acide aminé est S-acylé, l'homodimérisation de ST3GAL2 est inhibée suggérant une étape de contrôle par la palmitoyltransférase (Ramirez et al., 2017). Sans avoir été démontré pour les sialyltransférases, la palmitoylation affecte l'association aux membranes et le transport intracellulaire des protéines modifiées (Daniotti et al., 2017).

H. Localisation des sialyltransférases

1. Dans la cellule

Les sialyltransférases sont localisées au sein de l'appareil de Golgi. Celles-ci sont retenues à la membrane par leur unique domaine transmembranaire. Agissant dans les dernières étapes de la glycosylation, il est logique de retrouver ces enzymes au niveau du *trans*-Golgi. Cependant il a été montré que certaines sialyltransférases pouvaient se trouver également au niveau de la membrane plasmique permettant une synthèse de ganglioside directement au niveau de la membrane plasmique (Crespo et al., 2010) ou participerait à la resialylation des protéines membranaires recyclées (Burger et al.) modifiant ainsi l'interaction de la cellule avec son environnement. La région tige serait impliquée dans la rétention dans l'appareil de Golgi. Toutefois, cette région peut être clivée par la protéase BACE1 (β -site amyloid precursor protein cleaving enzyme) pour former une protéine soluble qui va suivre la voie de sécrétion et se retrouver dans le milieu extra-cellulaire (El-Battari, 2003; Kitazume et al., 2006). Ce clivage module également l'affinité de la protéine vis-à-vis des substrats accepteurs qui voient leur affinité élargies à d'autres substrats accepteurs et ce, de façon corrélée avec l'importance de la troncature (Legaigneur et al., 2001).

2. Dans les tissus

La sialylation a lieu dans tous les tissus chez l'Homme. Cependant la localisation de chaque sialyltransférase n'est pas forcément ubiquitaire. La base de données «The Human Protein Atlas» permet de donner des informations quant à leur localisation tissulaire. Parmi celles qui sont ubiquitaires on retrouve ST3GAL1, 2 et 6, ST6GAL1, ST6GALNAC3, 4 et 6 ainsi que ST8SIA1 et 4. Les tissus où sont localisées les autres sialyltransférases sont le système nerveux central où l'on retrouve ST6GAL2, ST6GALNAC5, ST8SIA2, 3 et 5, les autres se trouvent au niveau du système digestif (ST3GAL3), du système reproductif (ST6GALNAC2, ST3GAL4 et 5) et au niveau des seins et des poumons (ST8SIA6). De manière intéressante, ce site nous apprend que l'on retrouve très peu de sialyltransférases dans le tissu adipeux si ce n'est ST3GAL1, 2 et 6 ainsi que ST8SIA1. Or ces sialyltransférases, hormis ST3GAL6, sont spécifiques des gangliosides. Le tissu adipeux, riche en glycolipides, semble donc un tissu idéal pour l'expression de ces enzymes. Il est donc tentant de penser qu'un mécanisme régulateur permettant l'expression de la sialyltransférase se met en marche lorsque le substrat de l'enzyme s'y trouve. On peut supposer que les sialyltransférases s'expriment au niveau des tissus qui expriment leur substrat avec une possible rétro-action de la sialyltransférase

sur le substrat pour rééquilibrer les niveaux selon les besoins cellulaires. Ce principe est déjà connu chez les bactéries avec l'opéron lactose. Dans cet exemple, le gène permettant l'expression de la B-galactosidase, enzyme hydrolysant le lactose, est activé par la présence de galactose qui se lie au répresseur du gène, l'empêchant ainsi de se fixer au promoteur et d'inhiber l'expression de cette enzyme. Pour renforcer cette hypothèse quant aux sialyltransférases, il a déjà été observé que la quantité d'acide sialique dans les cellules pouvaient influencer l'expression des sialyltransférases (Bork et al., 2017). On peut appliquer ce principe sur d'autres sialyltransférases, c'est pourquoi il n'est pas étonnant de retrouver ST8SIA2 et 4 au niveau du système nerveux central étant donné la quantité d'acides polysialiques dans ce tissu.

Considérant le sang comme un tissu à part entière on retrouve également des sialyltransférases dans la partie acellulaire du tissu débarrassé des protéines de coagulation : le sérum. La présence de ST6GAL1 dans le sérum se justifie par le fait qu'elle peut être clivée par BACE1 et peut donc être sécrétée dans le milieu extracellulaire (Kitazume et al., 2001). Des études qui ont suivi ont montré que BACE1 est également active sur ST3GAL1, 2, 3 et 4 ainsi que sur ST8SIA4 (Kitazume et al., 2006). L'équipe de Joseph Lau s'est intéressé à l'intérêt biologique de ST6GAL1 dans le sérum. Ils ont démontré que cette enzyme inhibe la granulopoïèse en sialylant, de façon exogène, les progéniteurs des monocytes (Dougher et al., 2017). Bien qu'il n'y ait pas de CMP-Neu5Ac dans le sérum, ces sialyltransférases sont capables d'utiliser l'acide sialique produit par les plaquettes activées et le transférer directement sur les glycoconjugués portés par la cellule cible (Lee et al., 2014).

I. Spécificités enzymatiques des sialyltransférases

Au sein de l'appareil de Golgi, chaque sialyltransférase possède une spécificité vis-à-vis d'un type de substrat accepteur. La spécificité de substrat des sialyltransférases humaines (Harduin 2001 biochimie) est résumée dans le tableau 5.

Tableau 5. Spécificité des sialyltransférases. Inspiré de Harduin-Lepers 2013 (Harduin-Lepers, 2013).

Sialyltransférases	Substrats	Structures formées
ST6GAL1	<i>N</i> -glycoprotéines	Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc
ST6GAL2	<i>N</i> -glycoprotéines	Neu5Ac α 2-6Gal(NAc) β 1-4GlcNAc
ST6GALNAC1	<i>O</i> -glycoprotéines	(Neu5Ac α 2-3)0-1(Gal β 1-3)0-1GalNAc-Ser Neu5Ac α 2-6

ST6GALNAC2	O-glycoprotéines	(Neu5Ac α 2-3)0-1Gal β 1-3GalNAc-Ser Neu5Acα2-6
ST6GALNAC3	O-glycoprotéines/ Glycolipides	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GalNAc-Ser Neu5Acα2-6
ST6GALNAC4	O-glycoprotéines/ Glycolipides	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GalNAc-Ser Neu5Acα2-6
ST6GALNAC5	Glycoprotéines/ Glycolipides	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4GlcNAc-Ser Neu5Acα2-6
ST6GALNAC6	Glycolipides	Gangliosides série α (GD1 α , DT1 α , GQ1 β)
ST3GAL1	O-glycoprotéines/ Glycolipides	Neu5Acα2-3Galβ1-3GalNAc- GD1a, GM1b, GT1b
ST3GAL2	O-glycoprotéines/ Glycolipides	Neu5Acα2-3Galβ1-3GalNAc- GD1a, GM1b, GT1b
ST3GAL3	Glycoprotéines	Neu5Acα2-3Galβ1-3/4GalNAc-
ST3GAL4	Glycoprotéines/ Glycolipides	Neu5Acα2-3Galβ1-4GlcNAc- Neu5Acα2-3Galβ1-3GalNAc
ST3GAL5	Glycolipides	Neu5Acα2-3Galβ1-4Glcβ-Cer
ST3GAL6	Glycoprotéines/ Glycolipides	Neu5Acα2-3Galβ1-4GlcNAc-
ST8SIA1	Glycolipides	Neu5Acα2-8Neu5Acα2-3Galβ1-4Glc-Cer
ST8SIA2	Glycoprotéines	(Neu5Acα2-8)_nNeu5Acα2-3Galβ1-4GlcNAc-
ST8SIA3	Glycoprotéines/ Glycolipides	Neu5Acα2-8Neu5Acα2-3Galβ1- Neu5Acα2-8Neu5Acα2-6GalNAc-
ST8SIA4	Glycoprotéines	(Neu5Acα2-8)_nNeu5Acα2-3Galβ1-4GlcNAc-
ST8SIA5	Glycolipides	GD1c, GT1a, GQ1b, GT3
ST8SIA6	O-glycoprotéines	Neu5Acα2-8Neu5Acα2-3Galβ1-3GalNAc-

Dans des essais réalisés *in vitro*, les sialyltransférases d'une même famille présentent des activités enzymatiques redondantes. C'est le cas pour ST3GAL1 et ST3GAL2 mais aussi pour ST8SIA2 et ST8SIA4 ou encore ST6GAL1 et ST6GAL2 chez l'Homme. Cependant, il faut prendre en compte la répartition tissulaire de ces enzymes et leur spécificité fine *in vivo*. Par exemple ST3GAL1 est plus affine des O-glycannes alors que ST3GAL2 est la principale sialyltransférase qui sialyle les gangliosides GD1a et GT1b dans le cerveau (Kono et al., 2018).

Par ailleurs, il a été démontré que certaines sialyltransférases nécessitent de reconnaître la protéine sous-jacente avant de réaliser la sialylation. C'est notamment le cas de ST8SIA2 et ST8SIA4. Ces sialyltransférases interagissent avec les résidus d'acide aminés dans les domaines protéiques FN1 et Ig5 des protéines N-CAM (Neural Cell Adhesion Molecule). Le domaine FN1, qui possède les résidus Arg-Gly-Asp, est requis pour sialyler le *N*-glycane du domaine Ig5 adjacent des N-CAM. Cependant, les O-CAM (Olfactory Cell Adhesion Molecule), des protéines apparentées aux N-CAM, ne sont pas polysialylées. Il a été remarqué que les résidus lysine et arginine, présents dans le domaine Ig5 des O-CAM, une fois placés sur leur place position homologue chez les N-CAM inhibaient la polysialylation. Inversement, remplacer les résidus lysine et arginine par leurs homologues présents chez les N-CAM, soit une sérine et une asparagine augmente la polysialylation des O-CAM, ce qui démontre l'importance de la lysine et l'arginine dans le processus de polysialylation (Thompson et al., 2013). De même, une interaction directe du motif acide porté le domaine FN1 avec un motif polybasique porté par ST8SIA4 a été mis en évidence par la même équipe (Bhide et al., 2017). Ces résultats indiquent que les polysialyltransférases reconnaissent la composition en acide aminé avant de réaliser la polysialylation. C'est également le cas de la ST6GALNAC2 humaine qui requiert une protéine sous-jacente pour être active (Samyn-Petit et al., 2000). Ces expériences nous permettent d'extrapoler que toutes les sialyltransférases doivent d'abord reconnaître le substrat protéique avant de sialyler, ce qui impliquerait que les sialyltransférases puissent être plus ou moins spécifiques d'une protéine et ne se contentent pas uniquement de reconnaître la partie glycanique du glycoconjugué (Thompson et al., 2013).

Des études ont montré que des troncatures au niveau du domaine *N*-terminal induisent des modifications dans la reconnaissance du substrat accepteur, mettant en lumière le rôle joué par cette région tige des sialyltransférases. L'étude de Legaigneur et al. a montré que plus la ST6GAL1 humaine était tronquée dans sa région tige et plus son activité vis-à-vis de la l'asialofétuine, l'asialotransferrine et l'asialo-orosomucoïde était importante, ce qui suggère qu'une troncature importante de cette enzyme entraîne une reconnaissance de substrats accepteurs plus large (Legaigneur et al., 2001). Par ailleurs, au niveau de la reconnaissance du glycane en lui-même, une troncature des 89 premiers acides aminés chez la ST6GAL1 humaine entraîne une sialylation des 2 branches du *N*-glycane avec une activité de sialidase (Luley-Goedl et al., 2016) alors que l'enzyme pleine taille possède une préférence pour la branche du mannose lié en α 1-3 (Barb et al., 2009; Joziassse et al., 1987).

Malheureusement peu de choses sont connues quant à l'utilisation des différents substrats donneurs par les sialyltransférases. Les principales études se sont intéressées à l'affinité des sialyltransférases vis-à-vis du substrat naturel majoritairement retrouvé chez l'Homme : le CMP-Neu5Ac. Il a été déterminé que ST3GAL1 délétée de ses 56 premiers acides aminés, conduisant à une enzyme délétée de son domaine transmembranaire et à sa sécrétion, possède un K_m de 13.7 μM (Vallejo-Ruiz et al., 2001). Quant à ST6GAL1, l'enzyme délétée de ses 28 premiers acides aminés, possède un K_m de 18 μM vis-à-vis du CMP-Neu5Ac (Legaigneur et al., 2001). Malheureusement, très peu de choses sont connues pour les formes sauvages des enzymes et quant à l'utilisation d'autres substrats donneurs naturels tels le CMP-Neu5Gc ou d'autres acides sialiques.

J. Mécanismes moléculaires de la réaction de sialylation

Les sialyltransférases catalysent la réaction de sialylation, c'est-à-dire le transfert d'un résidu d'acide sialique sur le monosaccharide accepteur en formant une liaison en alpha. Les sialyltransférases sont des invertant enzymes, ce qui signifie que la liaison impliquant le monosaccharide est inversée après la réaction. Pour la sialylation, le Neu5Ac est lié en β au CMP et en α au monosaccharide accepteur après sialylation. D'un point de vue mécanistique, on ne sait toujours pas si la sialylation fait intervenir une substitution nucléophile de type S_N1 ou S_N2 . Dans le premier cas, la libération du CMP crée l'intermédiaire oxocarbenium (Figure 29) qui subit ensuite une attaque nucléophile sur le carbone anomérique par l'hydroxyle déprotoné du substrat accepteur. Dans le second cas, la liaison avec le substrat accepteur et la libération du CMP se fait de manière simultanée (Crous and Naidoo, 2016). De plus, l'acide carboxylique porté par le carbone anomérique apparaît être un composant essentiel car il permet de former des liaisons électrostatiques avec le site de liaison de l'enzyme chargé positivement (Crous and Naidoo, 2016).

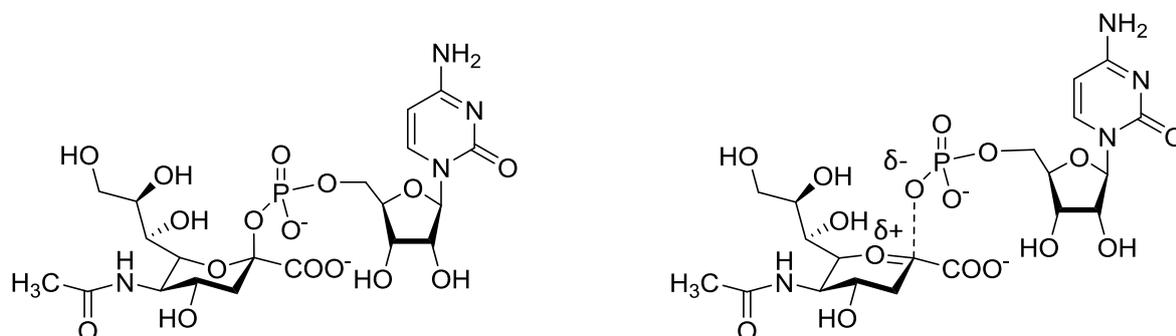


Figure 29. CMP-acide sialique (à gauche) et acide sialique avec l'ion oxocarbenium séparé du CMP (à droite).

Il apparaît que certains acides aminés conservés de la séquence protéique des sialyltransférases sont d'une importance cruciale pour le mécanisme de sialylation. C'est notamment le cas de l'histidine du sialylmotif III qui réagit avec l'hydroxyle porté par le carbone du monosaccharide accepteur engagé dans la liaison avec l'acide sialique. L'histidine interagit avec le proton porté par l'hydroxyle du substrat accepteur pour former un composé chargé négativement qui va ensuite réagir avec la partie électrophile de l'acide sialique, soit le carbone anomérique. La liaison entre le monosaccharide et l'acide sialique va opérer un changement conformationnel chez l'acide sialique

qui va adopter un état de transition portant un ion oxocarbenium ($\text{R}^+\text{C}(\text{R})_2$). Cet état de transition est dépendant de la formation d'une nouvelle liaison avec le carbone anomérique qui modifie sa conformation électronique et celle des atomes dans lequel il est engagé pour se séparer de la liaison formée avec le CMP et former une nouvelle liaison avec le substrat accepteur. L'oxygène de l'acide sialique, lié au carbone anomérique, prend une charge partielle positive en subissant l'attraction des électrons du carbone anomérique par les atomes d'oxygène du phosphate du CMP et celui du monosaccharide accepteur qui eux prennent une charge partielle négative (Figure 30).

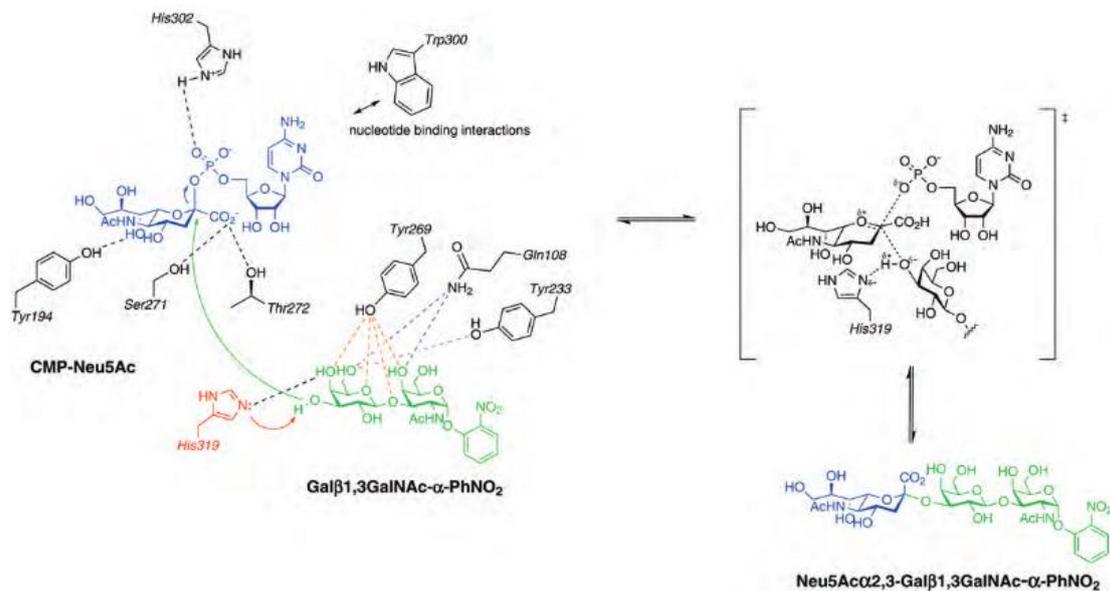


Figure 30. Mécanisme de réaction de la sialylation et interaction avec les acides aminés de ST3GAL1 de porc (*Sus scrofa*). L'hydroxyle du disaccharide accepteur (en vert) va réagir avec l'acide carboxylique porté par le CMP-Neu5Ac (en bleu). Les différents acides aminés impliqués directement dans la réaction sont répartis autour des molécules et notamment l'histidine 319 (en rouge, présente dans le sialylmotif III) qui va réagir avec le proton de l'hydroxyle de l'accepteur pour former un composé déprotoné nucléophile. La sialylation passe par un intermédiaire portant un ion oxocarbenium (entre crochets) et se lie au disaccharide accepteur. Issu de Rakic et al., 2013.

K. Evolution moléculaire des sialyltransférases

Il existe des sialyltransférases, ou des protéines apparentées, dans toutes les espèces vivantes. Ces familles de sialyltransférases sont toutes présentes au sein de la base de données CAZy. Chez les plantes et bactéries, on trouve des CMP-Kdo transférases classées dans la famille CAZy GT30 et qui présentent une conformation de type GT-B. Notons aussi que la plupart des sialyltransférases bactériennes se répartissent en 3 familles CAZy GT38, GT52 et GT80 selon leur structure et leur activité. Concernant les sialyltransférases de la famille GT29, dont font partie les sialyltransférases humaines, une étude très récente menée dans l'équipe a permis d'identifier des séquences homologues dans la plupart des génomes des grandes classes d'eucaryotes (Opisthokonta, SAR, Archeplastida, Chromalveolata) et même d'alpha-protéobactéries. Par le passé, quelques séquences s'apparentant aux GT29 ont été décrites chez les viridiplantae (plantes vertes) et chez certains protistes prasinophytes (Moreau et al., 2012; Shah et al., 2003) bien qu'aucune activité de sialyltransférase n'ait été clairement démontrée dans ces organismes (Séveno et al., 2004). Toutes ces protéines homologues aux sialyltransférases de la famille GT29 possèdent les sialylmotifs L, S, III et VS, suggérant un ancêtre commun (Harduin-Lepers et al., 2005; Teppa et al., 2016). Une analyse de phylogénie moléculaire de cette machinerie de sialylation incluant ces sialyltransférases de la famille GT29 et d'autres enzymes du métabolisme des acides sialiques en retrace l'origine très ancienne chez le dernier ancêtre commun aux eucaryotes (LECA). Ces résultats indiquent que ces séquences de sialyltransférases de la famille GT29 pourraient être issues de l'évènement endosymbiotique d'alpha-protéobactéries à l'origine des mitochondries (Petit et al., 2018) (Figure 31A). Cependant, cette capacité de sialylation a été perdue au cours de l'évolution dans certaines branches dont les archaeplastida (organismes capables de réaliser la photosynthèse).

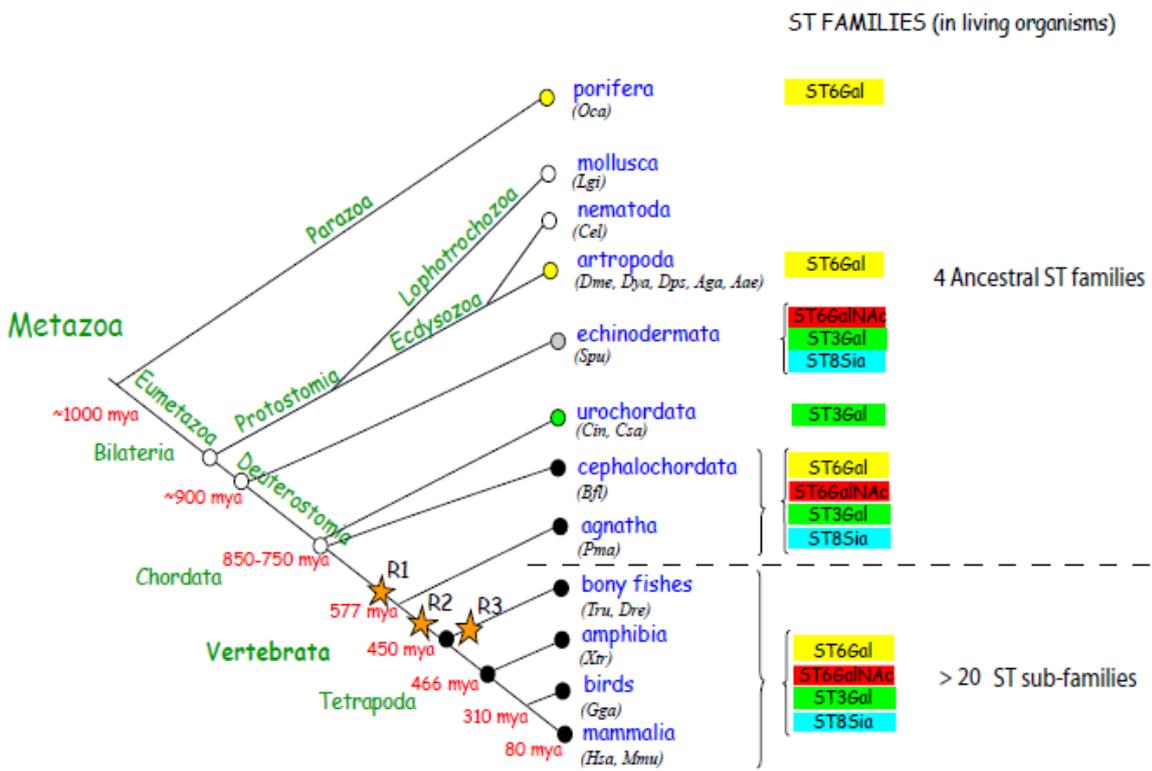
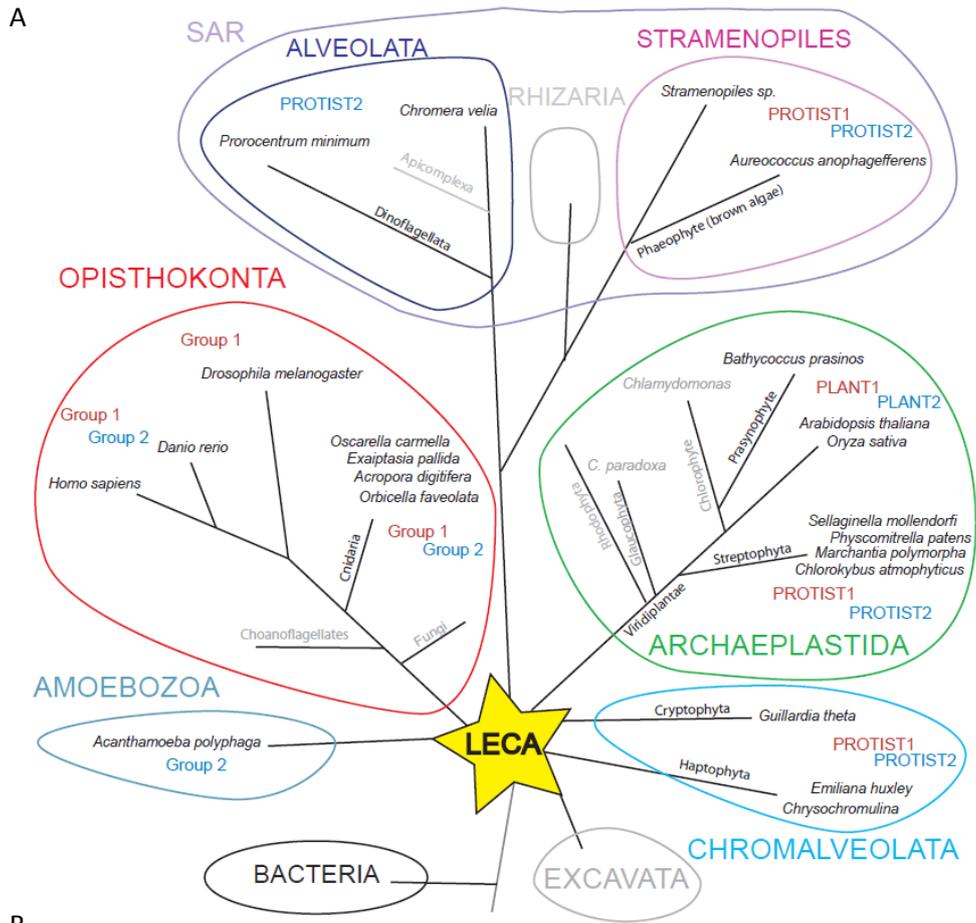


Figure 31. Evolution des sialyltransférases. A) Arbre phylogénétique des sialyltransférases GT29 et celles associées chez les eucaryotes. Les cercles indiquent les différents groupes monophylétiques des eucaryotes i.e. opisthokontes (rouge), SAR (Stramenopiles, Rhizaria, Alveolata) (rose), Archaeplastida (vert), hacrobia (bleu) et excavata (gris). La taille des branches n'est pas à l'échelle. Les organismes présentant une ou plusieurs sialyltransférases GT29 sont indiqués en noir alors que ceux ayant perdu les séquences de sialyltransférases sont indiqués en gris. Tiré de (Petit et al., 2018). B) Schéma du modèle évolutif des 4 familles de sialyltransférases. La majorité des événements de duplication complète du génome ont eu lieu très tôt dans la lignée des vertébrés (R1, R1 et R3) permettant l'apparition de sous famille qui ont été maintenues ou non durant l'évolution des vertébrés. Les 20 sous famille de sialyltransférases décrites chez les mammifères sont retrouvés chez les poissons osseux. Tiré de (Harduin-Lepers, 2013).

Au cours de l'évolution des métazoaires (animaux multicellulaires eucaryotes et hétérotrophes), et plus particulièrement lors de l'émergence des vertébrés, plusieurs duplications complètes du génome ont eu lieu, créant une grande diversité de fonctions réalisées par les sialyltransférases (Figure 31B). La plupart de ces gènes dupliqués disparaissent par accumulation de mutations ou par l'apparition d'une enzyme non fonctionnelle (pseudogénéisation). Parfois, le gène dupliqué est conservé au cours de l'évolution et la fonction moléculaire ancestrale peut être répartie entre les 2 nouveaux gènes (sous-fonctionnalisation) ou alors l'un des gènes dupliqués peut acquérir une toute autre fonction (néofonctionnalisation) (Figure 32) (Teppa et al., 2016). Pour ce qui concerne les gènes de sialyltransférases, ces duplications de génome qui ont généré plusieurs dizaines de sous-familles plus ou moins conservées au cours de l'évolution des vertébrés. Elles expliquent la présence des 20 sous-familles bien décrites chez l'Homme et de plus de 30 sous-familles chez le poisson-zèbre *Danio rerio*, qu'il reste à caractériser.

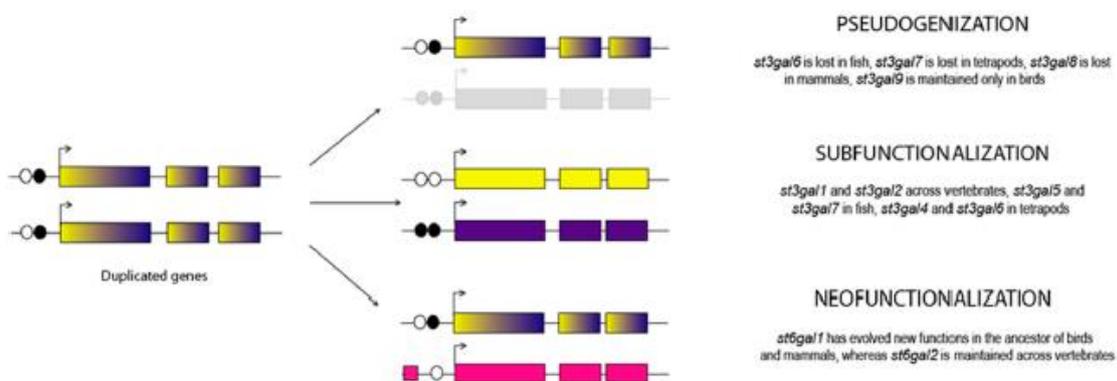


Figure 32. Evolution des gènes de sialyltransférases après les événements de duplication complète du génome. Sur le côté gauche, représentation schématique du duplicat de gènes polyexoniques codant pour les sialyltransférases (les exons sont colorés et les éléments régulateurs sont représentés en cercles blanc ou noir). Sur le côté droit, les 3 événements moléculaires impliqués dans la création de nouveaux gènes de sous-familles. (1) Pseudogénéisation : perte du gène. (2) Sous-fonctionnalisation : la séquence codante et les éléments régulateurs évoluent et s'organisent selon

les fonctions moléculaires voulues. (3) Néofonctionnalisation : un des gènes dupliqués accumule des mutations dans sa région codante ou dans ses éléments régulateurs donnant lieu à de nouvelles fonctions moléculaires. Tiré de (Teppa et al., 2016).

L'étude de la synténie, autrement dit l'étude des gènes entourant le gène d'intérêt sur le même chromosome dans 2 ou plusieurs espèces animales, permet d'établir les liens évolutifs (orthologie/paralogie) entre les gènes identifiés et d'observer la perte ou le gain de gènes après les événements de duplication du génome. Ainsi, il a été montré que le gène humain *ST6GAL2* présente une synténie très conservée au cours de l'évolution des vertébrés alors que la synténie autour du gène humain *ST6GAL1* est interrompue chez les téléostéens (poissons) indiquant de possibles translocations de ce gène au moment de l'émergence des poissons (Figure 33) (Petit et al., 2010).

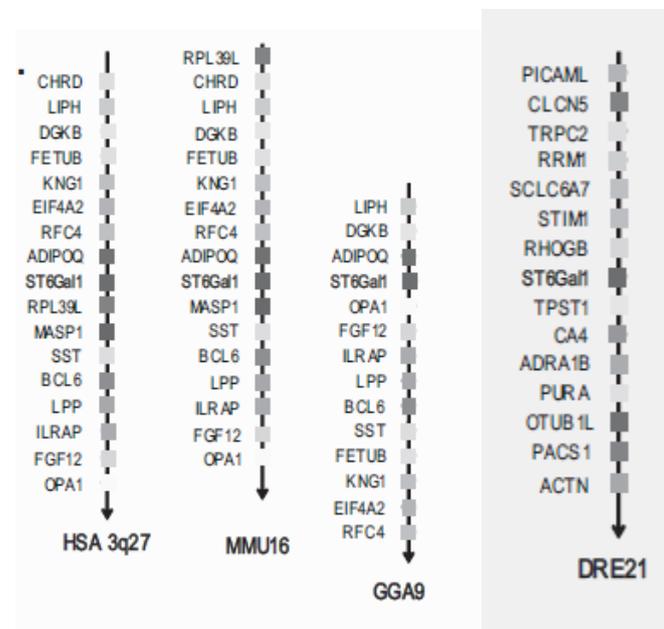


Figure 33. Synténie conservée autour de *st6gal1* chez *homo sapiens*, *mus musculus*, *gallus gallus* et interrompue chez le poisson *Danio rerio*. Tiré de Petit et al., 2010.

L'analyse des séquences protéiques des sialyltransférases, d'alignements multiples de ces séquences et la construction d'arbres phylogénétiques sont autant d'approches qui permettent de mieux comprendre le lien évolutif entre plusieurs séquences protéiques et leurs divergences fonctionnelles. Ces analyses ont permis d'établir que durant l'évolution des vertébrés, *ST3GAL1*, *ST3GAL2*, *ST3GAL3* et *ST6GAL2* ont la séquence qui est restée la plus conservée alors que *ST6GAL1* chez les amniotes (animaux développant un amnios durant l'embryogenèse) et à moindre mesure *ST3GAL4* et *ST3GAL6* ont un niveau d'évolution très élevé en particulier dans leur domaine catalytique suggérant aussi une évolution de leur fonction enzymatique (Petit et al., 2010, 2015; Teppa et al., 2016). Cependant,

l'activité enzymatique associée aux différentes sialyltransférases n'est bien connue que pour les 20 enzymes humaines ou de souris mais pas ou très peu pour le reste des enzymes nouvellement décrites chez d'autres vertébrés. Il s'agit d'un champ d'investigation à part entière que d'établir les liens entre la structure et la fonction de ces gènes dupliqués et leur devenir dans les génomes et prédire leur activité enzymatique et leur spécificité de substrat. L'approche la plus aisée pour déterminer les fonctions des sialyltransférases se fait par des approches de bioinformatique (génomique comparative et phylogénie moléculaire) et d'analyse des séquences en acide aminé de ces glycosyltransférases et de la mise en relation avec des enzymes dont la séquence et la fonction sont connues. Enfin, l'analyse de l'expression des gènes peut également fournir des informations concernant l'évolution des sialyltransférases. A titre d'exemple pour ST6GAL1, l'expression du gène est ubiquitaire dans tous les tissus examinés des amniotes, alors que pour les amphibiens et les poissons, l'expression de *st6gal1* est comparable à celle de *st6gal2* des vertébrés (c'est à dire restreinte à quelques tissus) (Petit et al., 2010).

L'ensemble de ces analyses combinées indique que les gènes *st6gal1* et *st6gal2* partagent un ancêtre commun nommé *st6gal1/2*, dont un orthologue a été décrit et caractérisé chez la drosophile (Koles et al., 2004). Ces deux gènes sont issus des deux séries de duplications complètes du génome (WGD) qui ont eu lieu au moment de l'émergence des vertébrés, il y a 473 à 508 millions d'années. *st6gal2* est très conservée au cours de l'évolution des vertébrés suggérant une importance fonctionnelle de cette enzyme en particulier dans le système nerveux central des vertébrés à l'instar de son orthologue décrit chez la drosophile tandis que *st6gal1* a accumulé un grand nombre de changements dans sa séquence et dans son profil d'expression laissant supposer une néofonctionnalisation de ce gène chez les amniotes (Petit et al., 2010).

Ces données reflètent la complexité d'évolution des sialyltransférases. De plus, les mécanismes moléculaires permettant à chaque sialyltransférase d'obtenir une spécificité enzymatique propre ainsi que ses niveaux de régulation au niveau génique et protéique propres à chaque gène sont encore très peu connus. Ces mécanismes fondamentaux permettent de comprendre l'impact des sialyltransférases et des sialoglycoconjugués dans des conditions physio-pathologiques.

V. Importance des sialyltransférases et sialoglycoconjugués.

A. Les cancers

Le cancer est une pathologie caractérisée par une prolifération anarchique et anormalement importante des cellules au sein d'un organisme. Cette prolifération débute par une seule cellule qui a subi plusieurs mutations et a outrepassé les mécanismes de contrôle et de réparation. Celle-ci acquiert des notions de résistance à des inhibiteurs endogènes de la croissance cellulaire et favorise les voies cellulaires permettant la prolifération. Cette cellule mère va ensuite se diviser et acquérir de nouvelles mutations lui permettant d'acquérir de nouvelles propriétés. Parmi celles-ci on retrouve la capacité à digérer la matrice extracellulaire, l'intravasation pour arriver dans le système sanguin et la capacité à survivre dans ce nouveau milieu, l'échappement à l'immunité, l'extravasation pour coloniser un nouveau territoire et former une tumeur secondaire. Parmi ces cellules cancéreuses, certaines sont capables de devenir des cellules souches, c'est-à-dire entrer dans un état de « dormance » cellulaire leur permettant de s'auto-renouveler après des traitements anti-tumoraux et de reformer de nouvelles tumeurs responsables des récives. Il existe de nombreuses publications traitant du rôle des sialyltransférases dans la tumorigenèse avec une régulation de leur expression au niveau transcriptionnelle et traductionnelle entraînant une augmentation globale de la sialylation.

Par exemple, ST6GAL1 est capable de favoriser le développement du caractère souche chez les cellules cancéreuses. Cette enzyme est sur-exprimée dans les tumeurs pancréatiques et ovariennes métastatiques et favorise l'expression des gènes Sox9 et Slug, des facteurs conférant des propriétés souches aux cellules (Schultz et al., 2016). Il est difficile de penser que ST6GAL1 est capable de modifier directement l'expression de certains gènes mais il est fort probable que cette enzyme module ces différents caractères en modifiant le sialome des cellules. Les travaux de Wei et al. ont démontré que ST6GAL1 pouvait favoriser la progression du cancer de la prostate *via* la voie PI3K/Akt/GSK/B-catenine prouvant ainsi que la sialylation a un effet sur les voies de transduction (Wei et al., 2016). Cependant les glycoconjugués impliqués dans la transduction de ce signal n'ont pas encore été identifiés.

Au niveau du développement de résistance contre certains agents anti-cancéreux, il a été montré qu'une augmentation de la sialylation en α 2-6 de l'EGFR rend des cellules cancéreuses du colôn plus résistantes au gefitinib, une molécule anti-cancéreuse inhibitrice qui cible l'EGFR (Park et al., 2012). Par ailleurs, les travaux de Liu *et al.* ont montré qu'une hypersialylation en α 2-6 de l'EGFR inhibe sa dimérisation et son activation conduisant à une diminution de l'agressivité des cellules cancéreuses de poumon qui peut être atténué par l'action de FUT8 (Liu et al., 2011). Ces données montrent que la

sialylation a un effet important sur le développement cancéreux avec des mécanismes qui restent toutefois assez complexes.

Dernier exemple, une augmentation de la ST8SIA1, responsable de la formation du GD2, ganglioside de la série b, augmente la prolifération et la croissance tumorale des cellules MDA-MB-231 *via* une activation constitutive du récepteur MET, causée par une interaction avec le GD2 activant les voies de transduction MEK/Erk et PI3K/Akt (Cazet et al., 2010, 2012). Toutes ces observations sont également corrélées avec une augmentation de Neu5Ac, Neu5Gc et KDN dans les cellules cancéreuses (Inoue et al., 1998).

La présence de glycoconjugués sialylés modifiés a été remarquée dans les cellules cancéreuses. Au niveau des cellules de cancer du sein, on trouve principalement la mucine MUC1 portant principalement des *O*-glycannes avec un noyau de type 1 alors que les cellules saines expriment des noyaux de type 2. ST3GAL1, qui sialyle les noyaux de type 1 est également sur-exprimé dans ce type de cancer. Les auteurs ont remarqué que la glycosylation aberrante de MUC1 est corrélée, en partie, à la sur-expression de ST3GAL1 (Burchell et al., 1999). Par ailleurs, une sur-expression de ST3GAL1 dans les cellules cancéreuses est associée à un mauvais pronostic de survie chez les patients (Hakomori, 1989). ST3GAL1 augmente également la survie cellulaire des cellules de gliome avec une corrélation positive entre l'expression de ST3GAL1 et le grade de la tumeur (Chong et al., 2015).

Dans certains cancers, on retrouve une diminution d'expression de certaines sialyltransférases (Antony et al., 2014; Kawamura et al., 2008). La baisse d'expression de sialyltransférase dans les cancers semble contradictoire aux vues des propriétés de l'acide sialique que les cellules cancéreuses peuvent utiliser car, étant chargée négativement, les cellules fortement sialylées ont la capacité de repousser les autres cellules adjacentes porteuses d'acides sialiques, en plus d'autres propriétés. Mais cette modulation est extrêmement complexe et nécessite de prendre en compte les autres voies métaboliques. Ainsi, d'autres enzymes peuvent utiliser le substrat non utilisé par la glycosyltransférase réprimée. Par exemple, une baisse d'expression du gène *B4GALNT2*, impliqué dans la synthèse de l'antigène glucidique Sd^a (Neu5Ac α 2,3[GalNAc β 1,4]Gal β 1,-R), est observée dans des cas de cancers du côlon. Ce substrat Neu5Ac α 2,3Gal β 1,-R peut alors être utilisé par une α 1,3-fucosyltransférase conduisant à la formation de l'antigène glucidique associé aux tumeurs sialyl-lewis X , ce qui permet d'augmenter les interactions avec la E-selectine, augmentant les propriétés métastatiques de la cellule (Groux-Degroote et al., 2014).

La présence d'acide sialique dans le sérum est également modifiée dans des patients atteints de cancer. Plusieurs antigènes glucidiques sialylés ont fait leur preuve dans le diagnostic de patients tels

que le CA19-9, le sialyl-Lewis X et le sialyl Tn. Entre 98 et 99,5% de l'acide sialique total trouvé dans le sérum est retrouvé sous forme lié à des glycoprotéines (Zhang et al., 2018).

B. Les Congenital Disorders of Glycosylation

Dans un autre domaine de pathologies, il existe les CDG (Congenital Disorders of Glycosylation) qui sont des pathologies congénitales causées par une ou des déficiences au niveau de la glycosylation. Ces déficiences affectent l'ensemble des cellules de l'organisme et peuvent être classées en 2 types (Figure 34) :

- Le type I qui affecte la glycosylation dans le RE. Il en résulte une absence de N-glycannes au niveau de l'asparagine qui devraient être glycosylés.
- Le type II qui affecte la maturation des glycannes au sein de l'appareil de Golgi menant à des N-glycannes anormalement glycosylés.

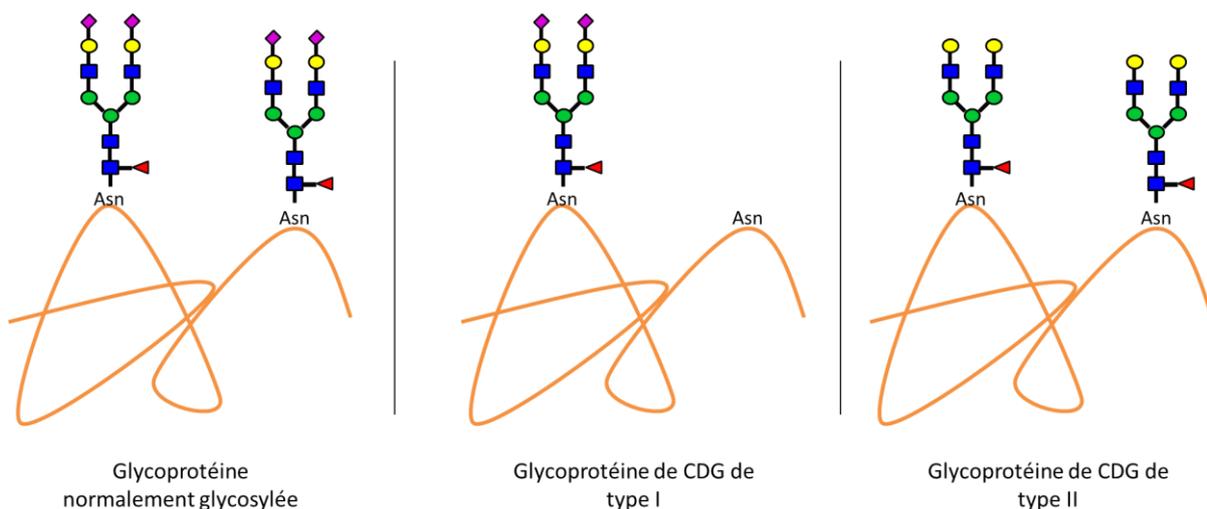


Figure 34. Schéma de glycoprotéines présentant les caractéristiques de différents CDG.

Parmi les CDG de type II impliquant les acides sialiques on retrouve le CDG-II_f également appelé SLC35A1-CDG selon la nouvelle nomenclature (Jaeken et al., 2009) où l'antiporteur présent à la membrane de l'appareil de Golgi chargé d'échanger une molécule de CMP-acide sialique avec une molécule de CMP est déficient. Deux patients présentant cette déficience ont été décrits à ce jour. Le premier présentait une macrothrombocytopénie (volume plaquettaire important) et une pancytopenie (diminution du nombre de globules rouges et blancs et de plaquettes), le second patient présentait un retard du développement associé à, une déficience aortique, une

macrothrombocytopenie, une protéinurie, présentait des convulsions et un manque de coordination sur les mouvements volontaires (ataxie)(Scott et al., 2014).

On peut également retrouver également des déficiences dans l'expression de sialyltransférases nécessaires à la formation *de novo* de glycoconjugués. C'est le cas de ST3GAL5, l'enzyme qui permet la synthèse du ganglioside GM3. Les patients sous-exprimant cette enzyme présentent des déficiences intellectuelles, des épilepsies, des déficiences visuelles et auditives et une choréoathetosis (mouvement involontaire) (Gordon-Lipkin et al., 2018). D'autre part, le syndrome de West est causé par une déficience en ST3GAL3. Cette pathologie se caractérise par une composition différente des tissus neuronaux qui pourraient entraîner des épilepsies et nuire au développement neural (Edvardson et al., 2013). Dans cette pathologie, une déficience en ST3GAL3 affecterait les propriétés d'adhérences des cellules neuronales durant le développement (van Diepen et al., 2018).

Les COG peuvent également moduler la localisation de certaines glycosyltransférases et créer des CDG. Grâce à des siRNAs, une sous-expression de la sous unité cog7 du lobe B cause des problèmes de stabilité pour la B4GALT1 et ST6GAL1 et les entraîne dans la voie rétrograde, le lobe A modifiant uniquement la structure de l'appareil de Golgi (Peanne et al., 2011). Chez ces patients, il en résulte une déficience au niveau de la glycosylation terminale.

C. Implication dans les fonctions neuronales et pathologies associés

Chez l'Homme, l'acide sialique est plus abondant au niveau du cerveau. On le retrouve associé à des gangliosides (65%) et des glycoprotéines (32%) alors que le reste est sous forme d'acide sialique libre. La quantité d'acide sialique au niveau du cerveau est plus importante chez l'Homme que chez le rat, la souris, le lapin, le mouton, la vache et le cochon (Wang and Brand-Miller, 2003) mais cette quantité est différente selon le lobe du cerveau. Effectivement, la concentration en acide sialique est plus importante de 22% dans le lobe gauche que le lobe droit (Wang et al., 1998) sans que l'on ne connaisse la cause de cette disparité. Dans cet organe, on retrouve majoritairement des chaînes d'acide polysialique (PSA) majoritairement associé aux NCAM (Neural Cell Adhesion Molecule) dont la fonction première est de favoriser la croissance des neurites en interagissant avec l'environnement des neurones (Yang et al., 2006).

Le PSA inhibe également les réactions immunitaires des cellules microgliales vis-à-vis des neurones *via* la Siglec-11 qui reconnaît cette structure saccharidique ouvrant la perspective à de futures thérapies. Ce moyen est également mis à profit dans la maladie d'Alzheimer où les plaques de β -amyloïde ont plus d'acide sialique au niveau de leur glycoprotéines et glycolipides (Salminen and Kaarniranta, 2009). Des études menées par Bernardo *et al.* ont montré que des souris

transgéniques développant la maladie d'Alzheimer et n'exprimant pas la GD3 synthase (aussi appelé ST8SIA1) éliminaient les plaques neuritiques sans conséquence notable (Bernardo et al., 2009) mettant en évidence l'implication de cette sialyltransférase et des acides sialiques polysialylés dans le développement de la maladie d'Alzheimer.

Le prion est un agent pathogène constitué d'une seule protéine dont la conformation est anormale, lui conférant des propriétés infectieuses au niveau des neurones et lui permettant de modifier la conformation d'autres protéines devenant ainsi d'autres prions. Cette protéine mal conformée est issue d'une protéine endogène normalement présente au niveau des ancras GPI. Ne pouvant être dégradé par la cellule, le prion s'y accumule et finit par tuer la cellule et former des plaques dans le cerveau. Les propriétés de cette protéine sont assez incroyables car elle ne peut être détruite que sous cycle d'autoclavage (134°C pendant 18 minutes sous 3 bars). Cette protéine possède 2 N-glycannes qui peuvent porter jusqu'à 5 acides sialiques. Des variations dans la structure et la composition du glycanne peuvent donner lieu à plus de 400 glycoformes de cette protéine (Stimson et al., 1999). La sialylation chez cette protéine est d'une importance cruciale car une protéine sous-sialylée aura une plus grande tendance à devenir pathogénique, de même elle aura plus facilement tendance à échapper au système immunitaire, à infecter d'autres espèces et à amplifier l'apparition de protéines prions (Katorcha et al., 2014). Récemment, cette même équipe a démontré que la protéine prion est majoritairement sialylée en α 2,6, c'est pourquoi les auteurs ont proposé que la sialylation de cette protéine serait influencée par les membres de la famille ST6GAL (Katorcha and Baskakov, 2017).

D. Modulation de la réponse immunitaire et maladies autoimmunes

Les acides sialiques ont une fonction extrêmement importante dans l'immunité. C'est pourquoi de nombreuses équipes étudient la relation entre acide sialique et l'immunité. Au niveau des acides sialiques en eux-même, un glycoconjugué porteur de Neu5Ac ou Neu5Gc ne sera pas reconnu de la même manière. Ainsi, le Neu5Ac est reconnu comme une molécule du soi par le complément H et n'entraîne donc pas la phagocytose de la cellule (Varki and Gagneux, 2012). Chez l'Homme, le Neu5Gc est immunogène et provient principalement de l'alimentation carnée. Une fois présent sur les glycoprotéines membranaires, il entraîne des inflammations chroniques (Padler-Karavani et al., 2008). Afin de recréer ces conditions, des souris mutées déficientes en CMAH, l'enzyme impliqué dans la synthèse de CMP-Neu5Gc, ont été nourries en Neu5Gc puis les auteurs ont réalisé un transfert passif d'anticorps anti-Neu5Gc afin de recréer les conditions inflammatoires retrouvées chez l'Homme. Le processus d'inflammation est complexe mais ferait intervenir

l'activation des récepteurs Fc sur les phagocytes, l'activation du complément ou par un Antibody Dependant Cellular Toxicity-like (ADCC-like) dont le mécanisme reste peu connu (Mahajan and Pillai, 2016). Il est intéressant de noter que l'espèce humaine est incapable de synthétiser du Neu5Gc car nous n'exprimons plus la CMAH et ce, depuis le dernier ancêtre commun avec les bonobos et les chimpanzés (Chou et al., 2002). Cette observation a mené le professeur Ajit Varki et son équipe à émettre l'hypothèse que cette perte d'expression est à l'origine de l'expansion de notre cerveau et de nos facultés humaines (Chou et al., 2002).

On retrouve également de l'acide polysialique dans le sang associées à des protéines sécrétées comme les NCAM (Glüer et al., 1998). Ces molécules sont impliquées dans la protection de l'effet cytotoxique d'histones relarguées par les neutrophiles. En effet, les neutrophiles sont capables de relarguer un cocktail d'agents anti-microbiens contenus dans les NETs (Neutrophils Extracellular Trap). Les NETs sont constitués d'ADN retenant les histones cytotoxiques et d'autres molécules anti-microbiennes (Figure 35) (Fuchs et al., 2007). Il a été montré récemment que les acides polysialiques sanguins pouvaient interagir avec ces histones et réduire leur effet cytotoxique (Zlatina et al., 2018).

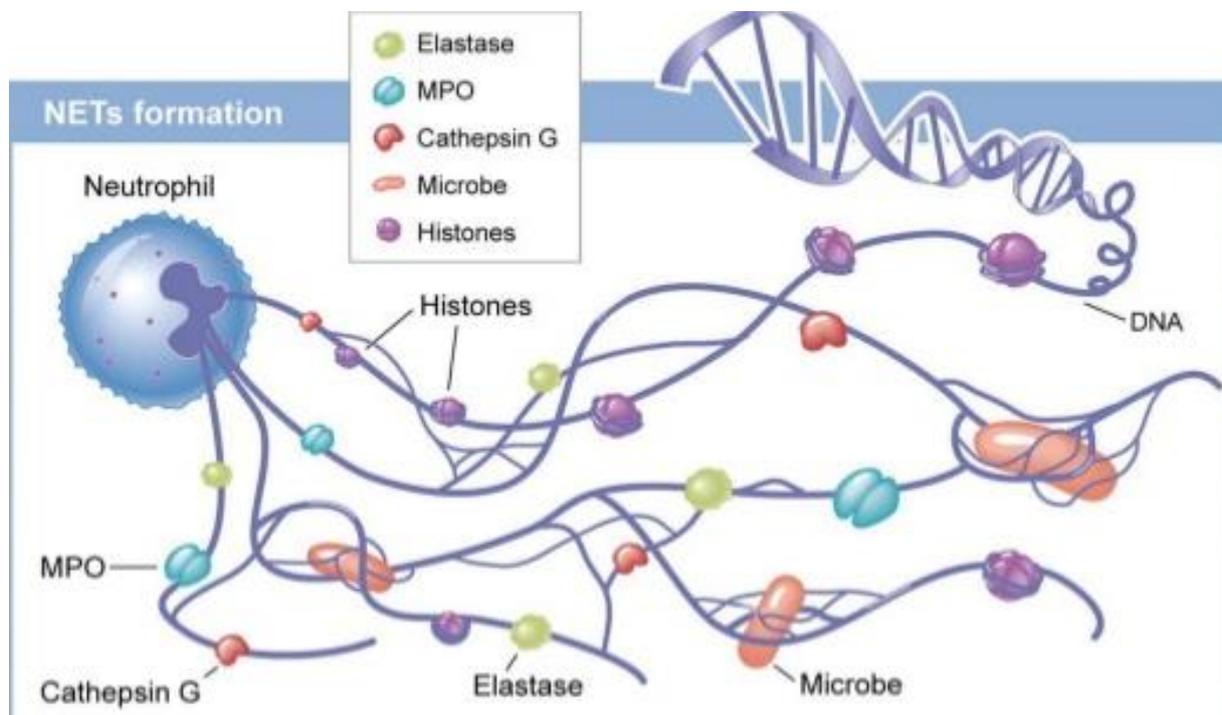


Figure 35. Schéma de la composition de NETs (Neutrophils Extracellular Traps). Les neutrophiles libèrent de l'ADN associés à des histones et d'autres molécules aux propriétés anti-microbiennes permettant l'élimination de pathogènes bactériens. (Adapté par slideshare.net. Réalisé par M.C. Claudia Bernadette Plata hipolita, Mai 2016)

Lorsque l'organisme se met à reconnaître des molécules du Soi, il se met à développer une auto-immunité dont les séquences peuvent être létales. La régulation de l'autoimmunité passe notamment par les molécules qui reconnaissent l'acide sialique. Celui-ci est présent en partie terminale non réductrice des glycanes sialylés ce qui lui permet d'être la première molécule impliquée dans les interactions avec l'environnement cellulaire. D'autant plus que sa présence a été estimée à 10 millions de molécules avec une concentration avoisinant les 100 mM au niveau du glycocalyx ce qui dénote de son importance pour la cellule. Parmi les protéines impliquées dans l'immunité et qui reconnaissent l'acide sialique on peut nommer la SIGLEC-2 (aussi appelé CD22) et la SIGLEC-G qui sont des molécules inhibitrices de la réponse immune. Un défaut d'expression de ces SIGLECs, principalement exprimées par les cellules B, est associé à l'autoimmunité (Mahajan and Pillai, 2016). Dans les cellules T, responsables de la destruction des cellules reconnues comme étrangères, la SIGLEC E interagit avec les TLRs (Toll-like receptor) et permet le recrutement de phosphatase intracellulaire inhibant ainsi les voies de transduction associées et inhibe la prolifération des cellules T (Perdicchio et al., 2016). Par ailleurs, les cellules apoptotiques exprimeraient moins d'acide sialique sur la surface cellulaire ce qui favoriserait leur dégradation par les macrophages (Savill et al., 2002).

Les acides sialiques permettent également de moduler la réponse immunitaire face à des pathogènes. Chez les neutrophiles, la SIGLEC 14 permet d'activer la réponse immunitaire en activant la voie Akt avec une augmentation de la sécrétion de l'interleukine-8 après stimulation au *Streptococcus* du groupe B alors la SIGLEC 5 permet d'avoir un effet antagoniste en recrutant une tyrosine phosphatase. L'expression de ces 2 SIGLECs permet ainsi de moduler la réponse immunitaire face à un pathogène (Ali et al., 2014). Il existe une hypothèse d'évolution incluant les SIGLECs et les pathogènes qui propose que les organismes doivent en permanence évoluer pour s'adapter à un nouvel environnement. Cet effet se nomme « red queen effect ». En ce qui concerne l'acide sialique, l'hôte modifie son profil d'expression pour échapper à la reconnaissance des pathogènes *via* ce monosaccharide. En retour ces pathogènes s'adaptent, modifiant leur reconnaissance de l'acide sialique. Par ailleurs ce changement d'expression chez l'hôte induit une modification de ces SIGLECs pour la reconnaissance de ces acides sialiques comme étant des molécules du Soi (Figure 36) (Varki, 2017).

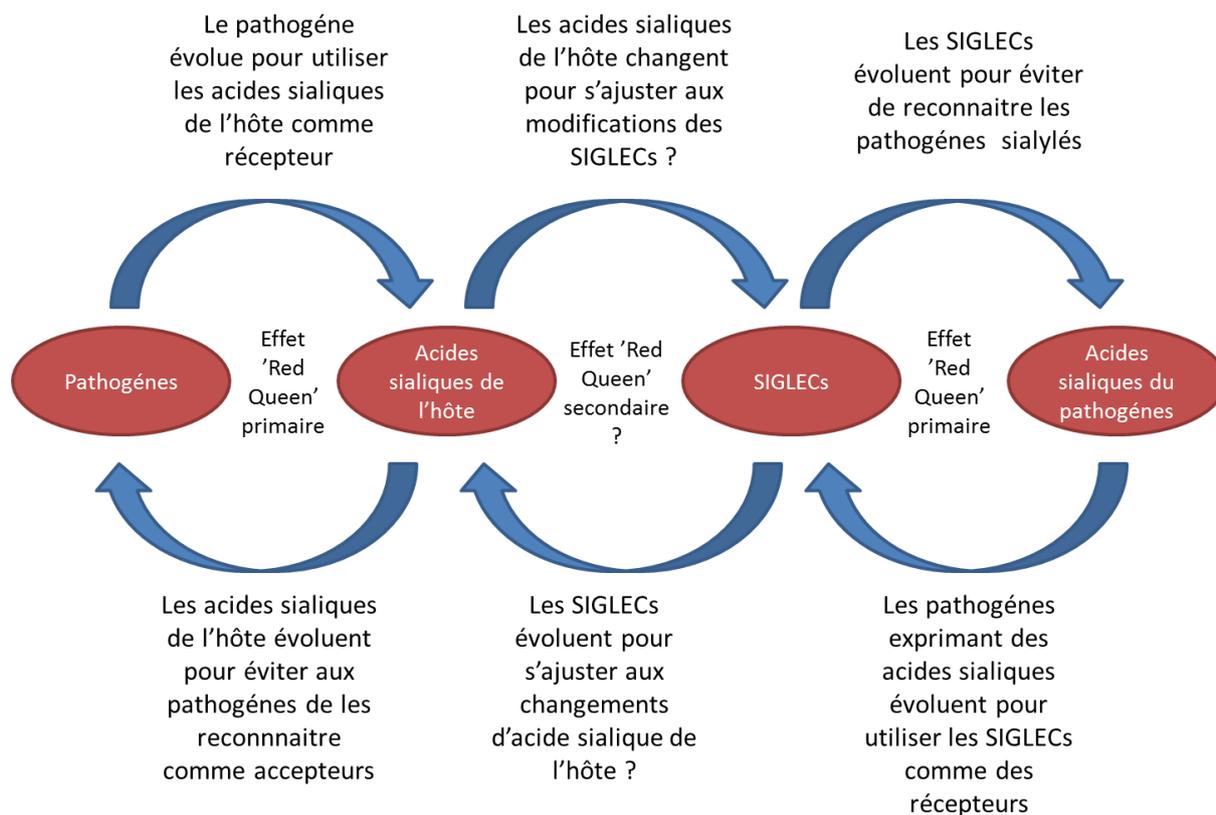


Figure 36. Schéma de l'effet « Red Queen ». Inspiré de Padler-Karavani et al., 2013.

Les modifications naturelles des acides sialiques interviennent également dans la modulation de la réponse immunitaire. C'est le cas de la 9-*O*-acétylation où l'acide sialique 9-*O*-acétylé est capable d'augmenter l'activation du B Cell Receptor (BCR) probablement par une interaction inhibitrice avec la SIGLEC-2 qui inhibe naturellement le BCR (Cariappa et al., 2009).

E. L'acide sialique dans les fluides corporels : implication dans la demi-vie des glycoconjugués et le développement des capacités cognitives chez le nourrisson

L'acide sialique est également présent dans le sang, on peut le retrouver sous forme libre ou associé à des glycoconjugués. En 1993, Gregoriadis *et al.* ont proposé d'utiliser les acides polysialiques, alors capables de protéger les bactéries et les cellules des agressions extérieures, pour protéger les molécules thérapeutiques et augmenter leur efficacité (Gregoriadis et al., 1993). De ce fait, il a ensuite été prouvé que l'acide polysialique pouvait atténuer la réponse immunitaire vis-à-vis d'une molécule immunogène, et que cette réponse était inversement proportionnelle à la quantité d'acide sialique porté par la glycoprotéine augmentant ainsi sa demi-vie (Fernandes and Gregoriadis, 2001). Cette capacité a été mise à profit par les laboratoires pharmaceutiques pour augmenter la

bioactivité de leurs molécules biopharmaceutique tel l'érythropoïétine utilisé pour traiter les anémies (Egrie et al., 2003).

La quantité d'acide sialique dans les fluides corporels est également représentative de l'état de l'individu. A titre d'exemple les femmes enceintes ont une quantité d'acide sialique plus importante dans la salive (Salvolini et al., 1998). Une autre étude montre également que la quantité d'acide sialique serait également corrélée avec l'intelligence des sujets. En 1980, Morgan et Winick ont injecté dans de jeunes rats de l'acide sialique, de façon intrapéritonéale et ont ensuite réalisé le test du labyrinthe. Ils ont remarqué que les sujets traités réussissaient mieux le test et que cela persistait dans le temps (Morgan and Winick, 1980). Un parallèle peut être fait entre l'acide sialique présent dans le lait maternel, la baisse d'activité de la GNE dans les premiers stades de développement embryonnaire et l'intelligence des individus car des études rapportent que des nourrissons nourris au lait maternel ont un QI supérieur aux enfants nourris au lait non maternel (Mortensen et al., 2002). De plus, la quantité d'acide sialique dans le sérum des femmes enceintes étant plus importante, on peut supposer que l'acide sialique traverse la barrière placentaire pour atteindre le nourrisson et l'approvisionner selon ses besoins.

F. Utilisation des acides sialiques et détournement de ces avantages par les virus, bactéries et parasites

Etant donné la quantité d'acide sialique présent au niveau de la membrane plasmique en position terminale des glycanes, il n'est pas étonnant qu'il soit utilisé par des microorganismes pathogènes à des fins de reconnaissance et d'invasion. Les virus de type influenza causant la grippe, reconnaissent l'acide sialique porté par les cellules épithéliales des voies respiratoires supérieures. L'hémagglutinine de ce virus reconnaît l'acide sialique porté en $\alpha 2,6$ au niveau de la membrane plasmique afin de pénétrer dans la cellule. Après formation de nouveaux virions au niveau de la surface cellulaire, la neuraminidase portée par le virion permet de cliver la liaison glycosidique de l'acide sialique et de libérer le virion lui permettant de coloniser de nouvelles cellules ou de nouveaux hôtes. De nombreux inhibiteurs ont été développés par la communauté scientifique pour inhiber l'entrée des virus (Han et al., 2017). Ces acides sialiques modifiés sur le C5 et le C9 portés par les glycoconjugués membranaire inhibent la reconnaissance par l'hémagglutinine viral.

L'acide sialique de l'hôte peut également être détourné par certains parasites comme *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. Ces parasites sont incapables de produire de l'acide sialique mais ils

possèdent une trans-sialidase qui transfère l'acide sialique de l'hôte aux pathogènes rendant leur détection par le système immunitaire plus difficile. Cette trans-sialidase est d'ailleurs sous l'effet d'intense recherche pour trouver un inhibiteur contre la maladie de Chagas (Neres et al., 2008). La trans-sialidase de *T. Cruzi* transfère l'acide sialique présent dans le sérum de l'hôte humain pour le transférer sur les mucines localisées sur sa membrane. Cet acide sialique protège ainsi le galactose sous-jacent et confère aux parasites une résistance aux systèmes du complément de l'hôte. De plus, les sialoglycoconjugués du parasite peuvent ainsi être reconnus par les SIGLECs-E des cellules dendritiques de l'hôte inhibant la production de cytokines pro-inflammatoires (Erdmann et al., 2009). Cette activité de trans-sialylation existerait également chez les bactéries et chez l'Homme mais les études à ce sujet sont peu nombreuses (Tertov et al., 2002).

G. Pathologies liées aux acides sialiques

Il existe 2 grandes pathologies liées à des déficiences au niveau de la voie de biosynthèse de l'acide sialique. La première est la sialurie qui est causée par une déficience de l'inhibition de la GNE par le CMP-Neu5Ac. Les patients atteints de cette pathologie présentent des problèmes respiratoires et hépatiques. La deuxième est la sialidose qui est causée par une déficience des neuraminidases lysosomales entraînant une accumulation des glycoconjugués sialylés. Dans cette maladie, la Neu1, normalement associée à la protéine protectrice (cathepsin A (sérine carboxypeptidase) et à une B-galactosidase, est déficiente (Khan et al., 2018). Les conséquences de la sialidose sont variables allant de la létalité embryonnaire au désordre visuel dans la 3^{ème} décennie de l'individu, selon le type de sialidose impliquée.

VI. Les différentes techniques d'étude

A. Les lectines

Les lectines sont des protéines qui reconnaissent des structures saccharidiques de façon réversible avec une spécificité relative. On retrouve des lectines chez les micro-organismes (virus, bactéries, champignons et organismes unicellulaires), les plantes et les animaux. Chez les plantes et les animaux, elles servent principalement à la reconnaissance d'organismes pathogènes, certaines d'entre elles sont également impliquées dans la formation de pores chez les bactéries (Mukherjee et al., 2014).

Parmi les lectines qui reconnaissent l'acide sialique on peut nommer la SNA (*Sambucus Nigra* Agglutinin) qui reconnaît l'acide sialique lié en α 2-6 au disaccharide Gal β 1-4GlcNAc et la MAL-I/II qui

reconnait l'acide sialique lié en α 2-3 sur le disaccharide Gal β 1-4GlcNAc et Gal β 1-3GalNAc respectivement.

Cependant la spécificité des lectines n'est pas absolue car elles sont, dans une moindre mesure, également capable de reconnaître des substrats non sialylés voire un disaccharide différent (Geisler and Jarvis, 2011; Shang and Van Damme, 2014) c'est pourquoi il est également possible d'utiliser des anticorps qui sont beaucoup plus spécifiques.

B. Les anticorps

Les anticorps sont des protéines produites par les plasmocytes et qui reconnaissent un antigène particulier favorisant l'opsonisation et l'activation du complément. Ces anticorps sont très spécifiques et sont donc utilisés pour la reconnaissance d'une structure particulière type sialyl Lewis x ou sialyl T. Ils sont principalement utilisés dans des techniques d'immunohistochimie afin d'associer un antigène glucidique à un état pathologique. Cependant, leur limite réside dans leur trop grande spécificité ne permettant ainsi pas d'avoir un aperçu global de l'état de sialylation de la cellule.

C. Les acides sialiques modifiés

Pour étudier l'importance des acides sialiques et des sialyltransférases dans différents processus, les chercheurs ont développé des acides sialiques modifiés afin de répondre à des questions fondamentales et parfois cliniques.

1. Les rapporteurs chimiques

Le principe du rapporteur chimique est d'utiliser une biomolécule couplée à une fonction chimique et ensuite de l'introduire dans le système vivant. La fonction chimique est ensuite utilisée pour marquer ou visualiser la biomolécule. Cette technique a été utilisée pour l'acide sialique dans des études fondamentales, tels que les interactions cellule-cellule et cellule-virus et la différenciation cellulaire (Büttner et al., 2002; Horstkorte et al., 2004a; Keppler et al., 1995) et également appliquée à des organismes entiers dans des modèles murins (Prescher et al., 2004).

Le marquage et la visualisation de ces rapporteurs chimiques repose sur l'utilisation de réactions bioorthogonales qui sont résumées dans la récente revue de Gilormini et al. (Gilormini et al., 2018) et

sont nommées chimie-click. Certaines de ces réactions bioorthogonales reposent sur l'utilisation d'un groupement azoture ($R-N=N^+=N^-$) et d'un groupement alcyne ($HC\equiv CH$).

a) La CuAAC (Copper catalyzed Azide Alkyne Cycloaddition)

La CuAAC est caractérisée par la formation d'un groupement triazole entre le radical portant l'azoture et le radical portant l'alcyne. Cette réaction est catalysée par le cuivre (figure 37). L'avantage de cette technique est sa bioorthogonalité, c'est-à-dire qu'aucun de ces 2 groupements ne va réagir avec un composé naturel porté par la cellule. Cependant la présence du cuivre limite son utilisation dans le domaine du vivant car il est cytotoxique.

La réaction de CuAAC se déroule de la façon suivante, un premier atome de cuivre sous son état d'oxydation de 1 (Cu^{1+}) réagit avec la triple liaison du groupement alcyne, l'intervention d'un deuxième atome de cuivre lui permet de prendre la place du proton. Ce deuxième atome de cuivre ainsi positionné sur l'alcyne va pouvoir ensuite réagir avec le premier azote du groupement azoture, le dernier azote réagissant avec le premier carbone de l'alcyne. Ensuite la charge électronique se répartie entre les atomes libérant un atome de cuivre et un proton vient remplacer le dernier cuivre formant le groupement triazole liant de façon covalente le radical porté par l'alcyne et celui porté par l'azoture (Figure 37).

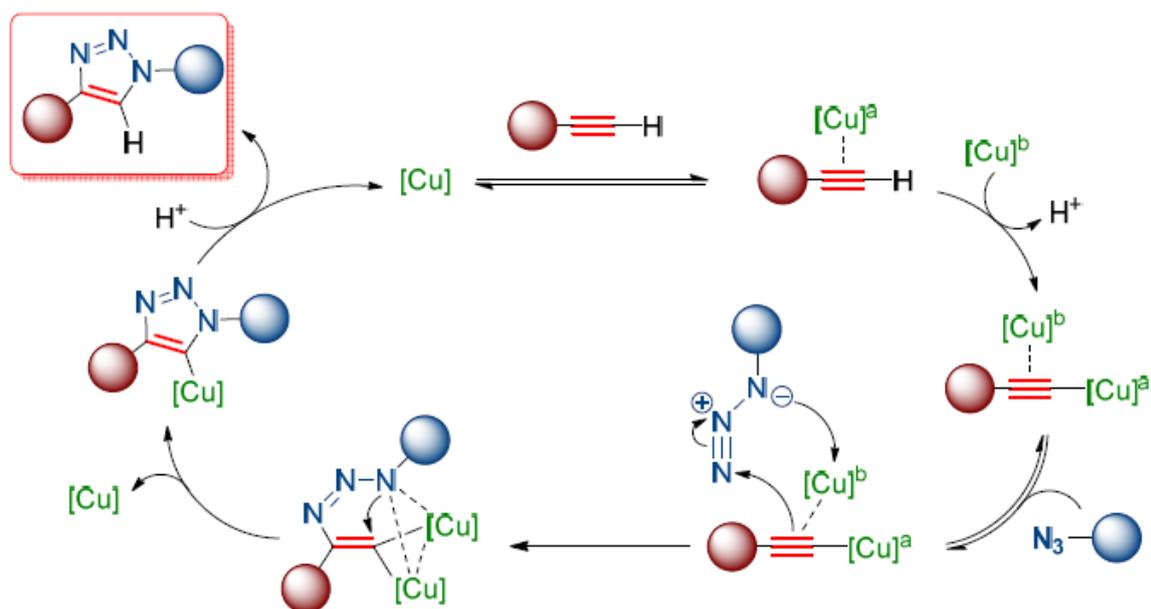


Figure 37. Mécanisme de la CuAAC. Tiré de (Worrell et al., 2013).

Cette technique a été effectuée pour visualiser l'incorporation du fucose (fuc) et de l'acide 3-désoxy-D-manno-oct-2-ulosonique (Kdo) dans la paroi cellulaire de la plante (Dumont et al., 2016). Des analogues du fucose (Fuc-Al) et du Kdo (Kdo-N3) ont été synthétisés et intégrés respectivement aux plants d'*Arabidopsis thaliana*. Deux réactions de CuAAC successives ont ensuite été réalisées. L'intérêt ici est l'utilisation d'un CuAAC croisé (rapporteur-alcyne et sonde azoture versus reporteur-azoture et sonde alcyne). Dans ces conditions particulières, aucune réaction croisée n'a pu être observée entre les azotures et les alcynes incorporés. Ces expériences ont permis de fournir des images révélant la présence de ces sucres modifiés au sein de la paroi cellulaire.

b) *La SPAAC (Strain promoted Azide alkyne cycloaddition)*

Cette technique a été développée par l'équipe de Carolyn Bertozzi et permet d'outrepasser les effets cytotoxiques du cuivre car elle utilise un groupement azoture sous la forme cyclique facilitant la formation de la liaison avec l'alcyne (Baskin et al., 2007) (Figure 38).

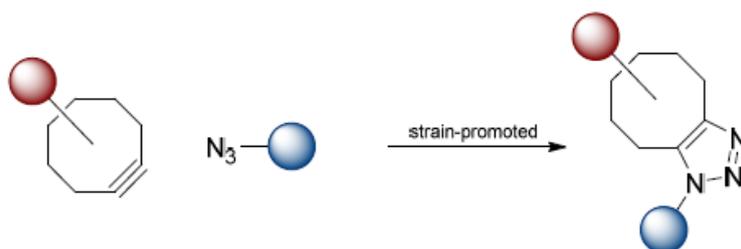


Figure 38. Schéma de la réaction de SPAAC.

Cette technique a notamment permis de visualiser tous les *O*-glycannes présents chez l'embryon de poisson-zèbre (*Danio rerio*) et leur position dans l'organisme au cours du temps. Les embryons ont été incubés avec l'Ac₄GalNAz et ensuite marqués avec le DIFO (Difluorooctyne) conjugués avec un fluorophore différent en fonction de l'heure post-fécondation, ce qui a permis de visualiser la formation des glycoconjugués sialylés au cours du développement de l'embryon (Figure 39).

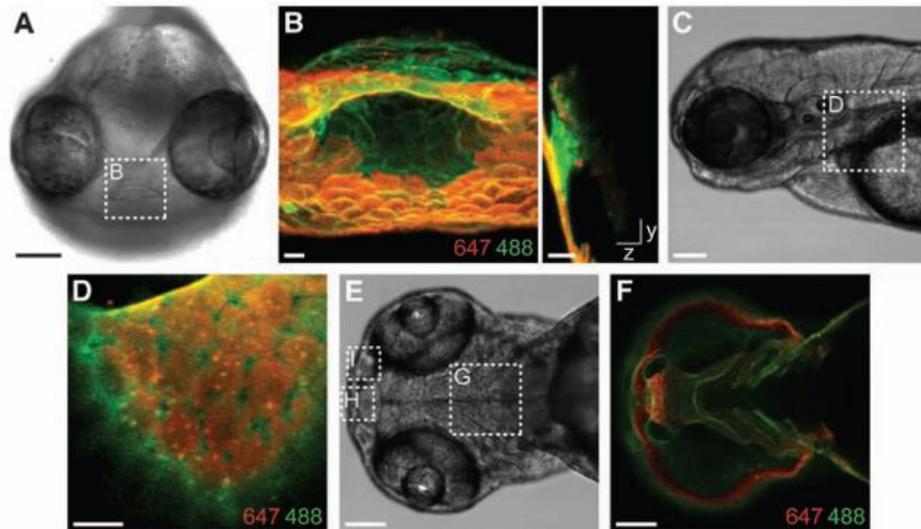


Figure 39. Expression temporelle de différents glycannes au cours du développement embryonnaire du poisson zèbre. Les embryons de poisson zèbre ont été marqué métaboliquement avec du Ac₄GalNAz de 3 à 60 heures post-fécondation (hpf) et repéré avec du DIFO-647 (en orange) entre 60-61 hpf et du DIFO-488 (en vert) entre 61-62 hpf. Tiré de (Laughlin et al., 2008).

c) La SEEL (Selective ExoEnzymatic Ligation) ou CEGL (ChemoEnzymatic Glycan Labeling)

Cette technique a été développée pour la première fois en 2013 par l'équipe de Geert-Jan Boons (Mbua et al., 2013). Elle possède un avantage que n'ont pas les autres techniques qui est la sélectivité envers un type de glycoconjugués grâce au choix de la sialyltransférase utilisée. elle exploite également les avantages de la chimie-click. Le principe est d'incuber dans le milieu de culture, une sialyltransférase avec un substrat donneur modifié. Une fois le substrat transféré, il est possible d'identifier ou de visualiser les acides sialiques transférés par chimie-click. Dans l'étude de Mbua *et al.*, des cellules fibroblastiques désialylées par une sialidase ont été incubées avec du CMP-SiaNAz, un acide sialique porteur d'un groupement azoture sur le C9, et la ST6GAL1 de rat. Après incubation, les auteurs ont utilisé la SPAAC pour coupler les acides sialiques transférés avec une biotine. Ils ont ensuite utilisé un anticorps anti-biotine couplé à un fluorophore visualisant ainsi les glycannes sialylés par ST6GAL1 (Figure 40) (Mbua et al., 2013).

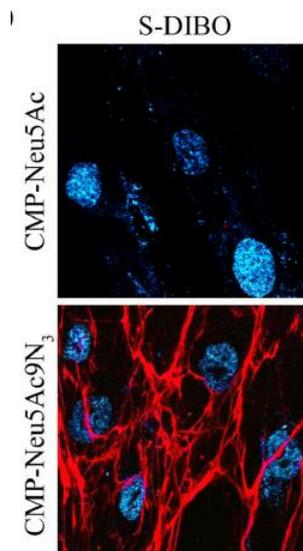


Figure 40. Localisation des protéines sialylées par ST6GAL1. Les fibroblastes humains ont été incubés avec soit du CMP-Neu5Ac ou du CMP-Neu5Ac9N₃ en présence de ST6GAL1 pendant 2 h à 37°C. Ensuite les cellules ont été incubées avec du S-DIBO pendant 1 h à température ambiante et avec de la streptavidine-Alexa fluor 568. Après lavages et fixation, le marquage du noyau a été fait avec du iodide TO-PRO-3. Les cellules ont été visualisées par microscopie confocale. Tiré de Mbua et al., 2013.

Plus récemment, l'équipe de Richard Steet, a pu aller une étape plus loin en identifiant les glycoprotéines porteuses de ces acides sialiques non naturels par spectrométrie de masse (Yu et al., 2016). Cette étude représente une avancée majeure pour la glycobiochimie car elle pourrait permettre de déterminer si les sialyltransférases ont des spécificités envers un certain type de protéine directement *in cellulo*.

Les dérivés d'acide sialique peuvent également être modifiés de sorte à être couplés directement avec un héparane sulfate (Figure 41). Dans l'étude de Capicciotti *et al.*, les auteurs ont utilisé un dérivé composé d'acide sialique et d'héparane sulfate en tant que substrat donneur sur une lignée déficiente en exostosine1, une enzyme impliquée dans la synthèse des héparanes sulfates. Le transfert de ce dérivé sur les glycoprotéines s'est fait de manière exogène, les cellules ont été incubées avec le dérivé composé d'acide sialique, lié par chimie click à l'héparane sulfate, et ST6GAL1 après un pré-traitement des cellules avec une neuraminidase. Après avoir vérifié le transfert de leur molécule, ils ont étudié si l'héparane sulfate associé à l'acide sialique pouvait agir comme co-récepteurs pour lier le FGF2 à son récepteur le FGFR, ce qui est le cas dans un système biologique normal. Une fois prouvé, les auteurs ont démontré que la voie ERK1/2, normalement activé par l'association de ces 2 récepteurs l'était également avec le dérivé menant à une

prolifération cellulaire. Ces types de dérivés peuvent donc être utilisés pour étudier les voies de transduction de différents récepteurs en modulant le sialome des cellules (Capicciotti et al., 2017).

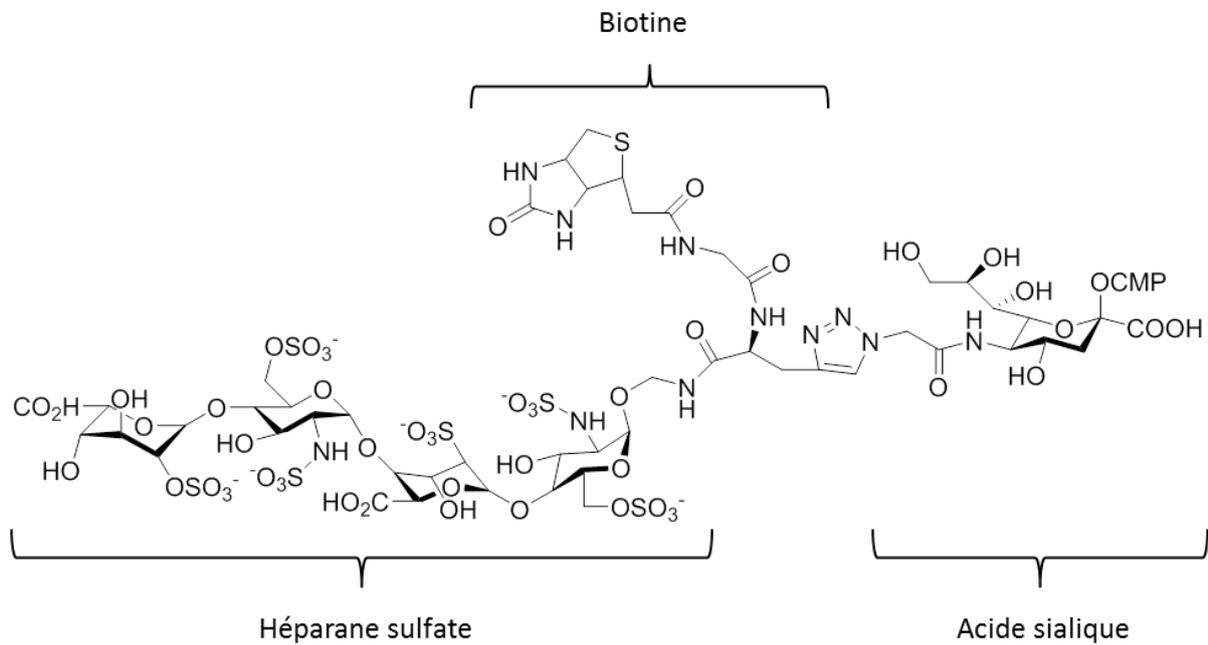
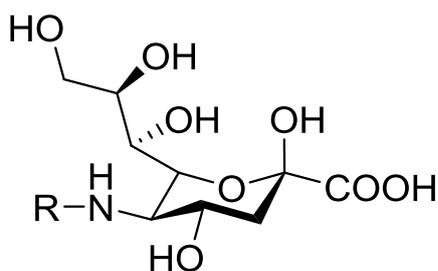


Figure 41. Représentation de la molécule composée d'acide sialique, d'héparane sulfate et de biotine. Cette molécule est transférée par la sialyltransférase à des fins de marquage. Reproduit à partir de (Capicciotti et al., 2017).

2. Les inhibiteurs des sialyltransférases

Différents acides sialiques porteurs de groupement acétyle, propionyle, butanoyle ou pentanoyle ont été utilisés avec les polysialyltransférases ST8SIA2 et ST8SIA4 (Figure 42). Les précurseurs non naturels des acides sialiques ont été incubés avec des cellules transfectées avec ST8SIA2 de souris ou ST8SIA4 de hamster. Il en résulte que ST8SIA2 est incapable d'utiliser tous ces substrats non-naturels contrairement à ST8SIA4 débouchant sur la découverte d'inhibiteurs spécifiques à ST8SIA4 (Horstkorte et al., 2004b).



R :

Acétyle : CO-CH₃
 Propionyle : CO-CH₂ - CH₃
 Butanoyle : (CH₂)₂ - CH₃
 Pentanoyle (CH₂)₃ - CH₃

Figure 42. Représentation des différents acides sialiques utilisés pour l'inhibition de ST8SIA2. Descriptif tiré de (Horstkorte et al., 2004b).

Des acides sialiques inhibant la sialylation ont également été développés en se basant sur l'état de transition apparaissant au moment de la sialylation en remplaçant l'ion carboxylique (COO-) par un amide (CO-NH₂) ou par un hydroxyméthyle (CH₂-OH). Grâce aux données structurales de la ST3GAL1 de porc (PDB : 2WNB), Crous et Naidoo ont pu étudier bioinformatiquement la dynamique moléculaire des 3 substrats cités précédemment ainsi que les forces électrostatiques mises en jeu pouvant perturber l'activité enzymatique. Cette étude a mené aux conclusions que le groupement carboxylate était important pour la synthèse d'inhibiteurs car il forme des ponts hydrogène avec la tyrosine 194 et la thréonine 272, ce qui réduit sa mobilité dans la poche catalytique. De plus, la forme ionisée du groupement carboxylate à pH physiologique permet d'interagir avec la poche catalytique chargée positivement de la ST3GAL1 de porc (Crous and Naidoo, 2016). Par ailleurs, l'étude de Danielle Skropeta a démontré qu'en remplaçant l'ion carboxylique par un groupement phosphonate (C-PO(OH)₂), ce qui ajoute une charge négative en plus, l'affinité d'une α 2,6 sialyltransférase de rat augmente pour ce composé, probablement *via* une augmentation des interactions électrostatiques avec les acides aminés basiques (Skropeta et al., 2004). De plus, il a été montré que l'interaction des sialyltransférases avec les inhibiteurs étaient également dirigée par la forme du composé, les interactions hydrogènes, sa charge et les interactions hydrophobes (Kumar et al., 2013).

Cependant, malgré les différentes avancées sur les inhibiteurs de sialyltransférases et leur possible utilisation dans le traitement de cellules tumorales, il se devra d'être spécifique à ces cellules. En effet, une étude dirigée par James C Paulson a démontré qu'en inhibant toutes les sialyltransférases avec le 3F-Neu5Ac (présence d'un atome de fluor sur le 3ème carbone), les souris traitées avec ce composé possèdent de sévères pathologies. Les organes les plus touchés sont le foie, avec une altération des protéines hépatiques, et les reins qui développent une insuffisance associée à une protéinurie (Macauley et al., 2014).

3. Etude de l'activité des sialyltransférases

Certains acides sialiques ont été développés pour déterminer les paramètres cinétiques de l'enzyme de façon simple, en évitant les protocoles longs et contraignants. L'équipe de Nishimura a développé un acide sialique fluorescent qui, une fois incubé avec la sialyltransférase d'intérêt et un substrat accepteur également fluorescent, était capable de réaliser du FRET une fois le transfert

effectué (Washiya et al., 2000). La fluorescence émise peut ainsi être quantifiée et il est aisé d'en déterminer les paramètres cinétiques en temps réel.

D. L'utilisation de substrats radiomarqués

Les radio-isotopes sont des éléments chimiques dont le nombre de protons ou de neutrons présents au niveau du noyau atomique est différent de celui retrouvé dans le tableau périodique de Mendeleïev. Cette instabilité atomique entraîne une radioactivité, c'est-à-dire le passage de cet état instable à un état plus stable accompagné de l'émission d'une particule énergétique.

Le radio-isotope couramment utilisé dans les essais de sialylation est le carbone 14 mais on peut également utiliser le tritium. Le carbone 14 étant en excès de neutrons, il émet des rayonnements β - lorsqu'il se désintègre. Dans ces essais enzymatiques, le substrat donneur utilisé est le CMP- ^{14}C Neu5Ac, le carbone 14 étant présent sur l'acide sialique, ce qui permet d'en suivre le transfert sur le produit sialylé formé. A la suite de la réaction de sialylation, la glycoprotéine est précipitée afin de la déposer sur un filtre et la radioactivité associée au filtre est ensuite comptée (Figure 43). Si le substrat accepteur est un glycolipide il est nécessaire de le purifier en utilisant une colonne de C18 qui va le retenir. Il faudra ensuite réaliser une élution et quantifier la radioactivité présente dans l'éluat.

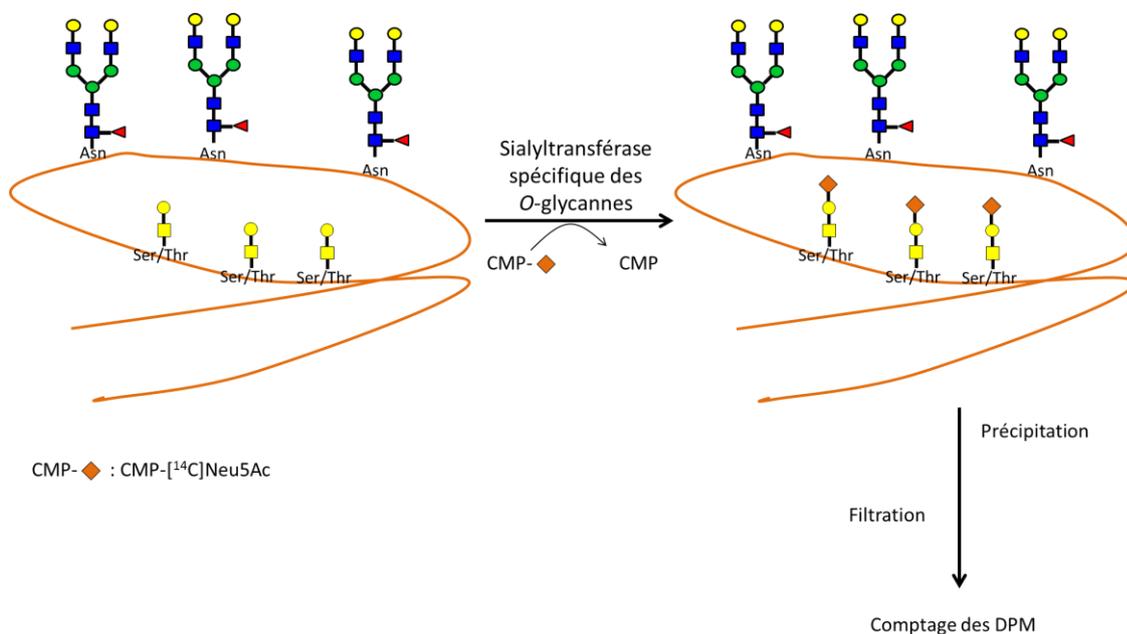


Figure 43. Principe du comptage de la radioactivité associée à la glycoprotéine sialylée.

Cette technique a été utilisée à de nombreuses reprises dans l'équipe d'Anne Harduin-Lepers pour caractériser l'activité enzymatique des sialyltransférases (Harduin-Lepers et al., 2000; Samyn-Petit et

al., 2000; Vallejo-Ruiz et al., 2001). Cependant, ces approches nécessitent un matériel et un environnement sécurisé et dédié qui n'en facilitent pas l'usage et la détection rapide ou à haut débit de ces activités enzymatiques.

E. Les tests colorimétriques

Il existe des kits développés par différentes sociétés afin d'étudier l'activité biochimique des sialyltransférases. Le premier a été développé par Wu *et al.* puis commercialisé par la société R&D. Ce kit utilise les propriétés du vert de malachite pour quantifier le phosphate libéré après sialylation grâce à une phosphatase qui va cliver la liaison entre le phosphate et la cytidine (Figure 44) (Wu et al., 2011). Ce kit est généralisable à d'autres glycosyltransférases car la phosphatase est capable d'hydrolyser la liaison entre le phosphate et d'autres nucléotides. Cependant il présente également de nombreux désavantages comme l'impossibilité d'utiliser des enzymes non purifiées ou des solutions tampons contenant du phosphate. De plus, le vert de malachite a été montré comme interagissant avec l'arséniate, un composant du tampon cacodylate largement utilisé dans les tests de sialylation.

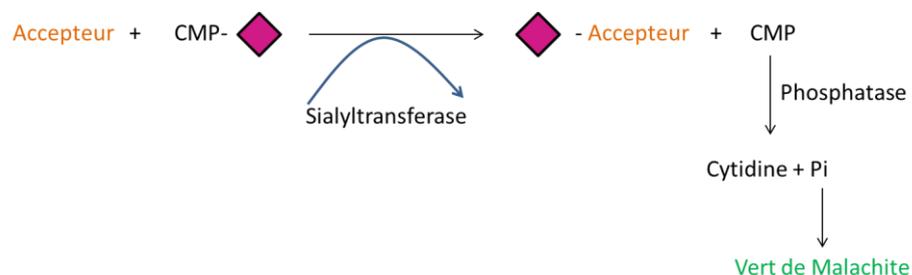


Figure 44. Principe de la réaction utilisée par le kit R&D. L'acide sialique du CMP-Neu5Ac est transféré au substrat accepteur par l'action d'une sialyltransférase. Le CMP relâché est ensuite pris en charge par une phosphatase qui va hydrolyser la liaison entre le phosphate inorganique et la cytidine pour le doser avec la réaction colorimétrique au vert de malachite.

Ce kit a été utilisé dans l'étude de Mbua *et al.* pour déterminer l'activité de la ST6GAL1 de rat commercial utilisé ensuite pour réaliser la SEEL mais également dans l'étude de Kelley Moremen pour étudier l'activité de la ST6GALNAC2 purifiée qu'ils ont ensuite cristallisée (Mbua et al., 2013; Moremen et al., 2018).

Il existe également un kit utilisé actuellement pour les galactosyltransférases mais en cours de développement pour les sialyltransférases. Ce kit est développé par la société Promega et converti l'UDP issu de la glycosylation en ATP qui est ensuite quantifié par un test de luciférase (Figure 45). Apparemment ce kit est compliqué à mettre en œuvre pour les sialyltransférases car la conversion du CMP en ATP est complexe.

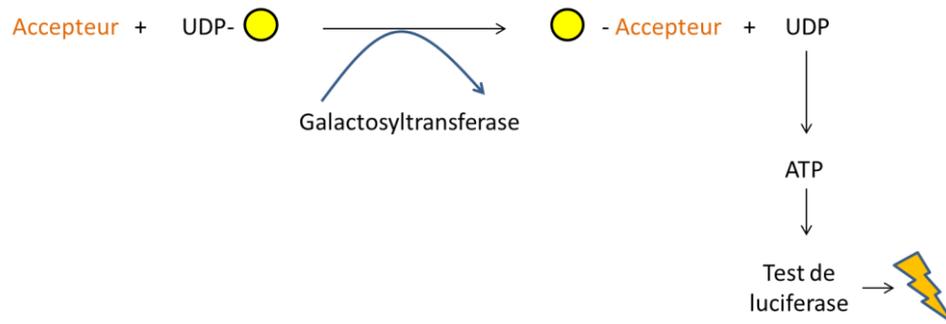


Figure 45. Principe de la réaction développée par Promega pour étudier l'activité des galactosyltransférases. Le galactose de l'UDP-Gal est transféré au substrat accepteur par une galactosyltransférase. L'UDP relargué est converti en ATP qui est ensuite utilisé par une luciférase pour réaliser une réaction lumineuse.

Toutes les sialyltransférases utilisent du CMP-acide sialique comme substrat donneur. Chaque enzyme présente sa propre spécificité vis-à-vis des accepteurs et de la liaison glycosidique formée. La diversité des molécules sialylées rencontrés dans la nature est liée à l'activité, la spécificité et la régulation des sialyltransférases. Cependant leurs propriétés enzymatiques ne sont pas complètement comprises. De nouvelles méthodes et des outils spécifiques sont nécessaires pour l'étude de la réaction de sialylation et les processus biochimiques associés.

Objectifs de la thèse :

La compréhension du fonctionnement des sialyltransférases est d'une importance primordiale d'un point de vue fondamentale et clinique. Mon projet de thèse vise à comprendre la relation entre la structure des sialyltransférases et leur fonction biochimique précise. Cependant ces objectifs seront atteints après le développement d'outils innovants afin d'en faciliter l'étude.

Ces outils sont basés sur l'utilisation de sialyltransférases recombinantes qui utilisent un acide sialique non naturel : le CMP-SiaNAI. Nous exploitons sa capacité à pouvoir être associé à divers tags qui permettent le repérage des glycoconjugués sialylés. Basé sur cette capacité, nous avons développé un nouvel outil permettant une détermination enzymatique des sialyltransférases de façon rapide, peu onéreuse, spécifique et sensible. Au préalable, nous nous sommes assurés que nos sialyltransférases recombinantes soient capables de l'utiliser et avons mesuré ces paramètres biochimiques, en les comparant avec le substrat naturel.

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'implication d'un acide aminé conservé chez ST3GAL1 dans sa localisation et son activité. Nous avons ensuite caractérisé l'activité enzymatique de la ST6GAL1 de poisson zèbre dans le but d'étudier l'évolution moléculaire de cette sous-famille. Des analyses bio-informatiques tendent à démontrer que la ST6GAL1 humaine a subi différentes modifications sur sa séquence en acides aminés permettant l'acquisition d'une néofonctionnalisation. Nous avons donc caractérisé son activité enzymatique et l'avons comparé à l'activité de l'enzyme humaine. Enfin nous avons étudié l'évolution moléculaire et biochimique entre la ST8SIA6 humaine et celle de poisson zèbre.

Le développement de ces outils permettra de valider ou rejeter les hypothèses émises lors d'analyses bio-informatiques qui sont à la base des études sur la relation structure-fonction. Ces études permettront de comprendre l'évolution moléculaire des sialyltransférases qui a conduit à la grande diversité de glycoconjugués sialylés. Elles permettront également de mieux cerner les processus biochimiques impliqués lors de la réaction de sialylation.

Résultats

I. Utilisation de ST6GAL1 et ST3GAL1 pour le développement de nouveaux outils d'étude des sialyltransférases

Il est maintenant admis que les glycosyltransférases golgiennes sont des enzymes membranaires exprimées en faible quantité dans la cellule, et sont particulièrement difficiles à produire en quantité suffisante *in vitro* pour servir de biocatalyseurs (Nidetzky et al., 2018). En outre, l'accès des sialyltransférases recombinantes spécifiques, que ce soit à des fins thérapeutiques ou expérimentales, est très restreint en raison de leur faible taux d'expression et leur activité limitée lorsqu'elles sont produites dans des hôtes tels que la levure, les bactéries ou encore les cellules d'insecte. Dans notre projet, nous avons choisi d'utiliser ST6GAL1 pour sa capacité à sialyler spécifiquement les *N*-glycannes des glycoprotéines et ST3GAL1 pour la sialylation des *O*-glycannes. Ce sont des enzymes très régulièrement utilisées et leurs propriétés biochimiques sont relativement bien connues. Ces deux sialyltransférases nous ont servi pour la mise au point des différentes techniques que nous avons développées. La première étape a été de produire des enzymes recombinantes actives et capables d'être sécrétées (ou non) dans le milieu de culture de cellules HEK293 (cellules humaines de rein). Ces cellules, dont le glycome est bien décrit (Fujitani et al., 2013), sont souvent utilisées à des fins d'expression de protéines recombinantes (Moremen et al., 2018). Avant de démarrer l'étude, nous avons procédé à l'analyse de leur transcriptome pour en déduire que *ST6GAL1* et *ST3GAL1* sont faiblement exprimés de manière endogène (données non montrées). Ainsi, ces cellules ont été transfectées transitoirement avec des plasmides permettant l'expression de ST6GAL1 et ST3GAL1 recombinantes. Chacune de nos constructions porte un tag 3XFlag coté *N*-ter afin de pouvoir repérer l'enzyme à l'aide d'un anticorps anti-FLAG, d'en suivre la production et de ne pas affecter son activité enzymatique. Ces approches de biologie moléculaire sont rapportées dans la section matériels et méthodes.

A. Constructions moléculaires pour la production des enzymes recombinantes : $\Delta 56$ ST3GAL1 et $\Delta 56$ ST6GAL1.

Tout d'abord, nous avons déterminé la durée de transfection optimale pour obtenir une production maximale de nos enzymes recombinantes. Nous avons utilisé des cellules HEK293 (Human Embryonic Kidney) afin de conserver un système d'expression orthologue et de respecter la glycosylation de protéines enzymatiques. Ces cellules ont été transfectées avec des plasmides permettant l'expression de différentes isoformes de ST3GAL1 et ST6GAL1 humaines et ont été récupérées après 12, 24, 36, 48 et 72 h de transfection. La figure 46 montre une analyse de la production de ST3GAL1 pleine longueur dans ces cellules HEK293 par Western Blot en utilisant un anticorps anti-FLAG. Cette expérience montre que le taux de production de nos enzymes est

maximum après 36 h de transfection. Cette expérience a également été réalisée avec ST6GAL1 et les formes tronquées dans le milieu de culture qui ont mené aux mêmes conclusions.

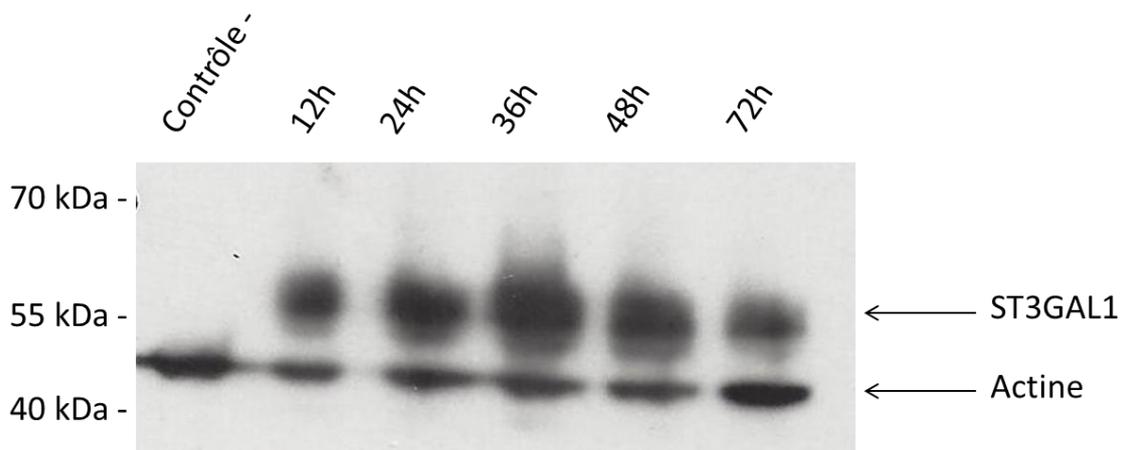


Figure 46. Détermination de la durée optimale de transfection. Les cellules HEK293 ont été transfectées avec un plasmide permettant l'expression de la ST3GAL1 pleine longueur. Les cellules ont été récupérées après 12, 24, 36, 48 et 72 h post-transfection et un Western-blot a été fait en utilisant un anticorps anti-flag et anti-actine. Une bande à 42 kDa est détectée pour la β -actine et plusieurs bandes sont détectées correspondant aux isoformes glycosylées de la ST3GAL1 humaine (Vallejo-Ruiz et al., 2001).

L'étape suivante a été de déterminer la troncature optimale pour obtenir une enzyme ST6GAL1 recombinante sécrétée dans le milieu de culture de cellules HEK293 avec une quantité et une activité satisfaisante. Pour cela, nous nous sommes appuyés sur une première étude de l'équipe qui a utilisé ST3GAL1 tronquée des 25, 56, 76 et 105 premiers acides aminés. Chaque construction a été transfectée dans des cellules COS-7. Après récupération des milieux de culture, un test d'activité enzymatique a permis de déterminer que l'isoforme $\Delta 56$ ST3GAL1 possédait la meilleure activité enzymatique (Figure 47) (Vallejo-Ruiz et al., 2001). Ces essais d'activité sur différentes troncatures de la protéine mettent en évidence que le nombre d'acides aminés délétés a un impact sur l'activité enzymatique et que ces mises au point sont donc essentielles.

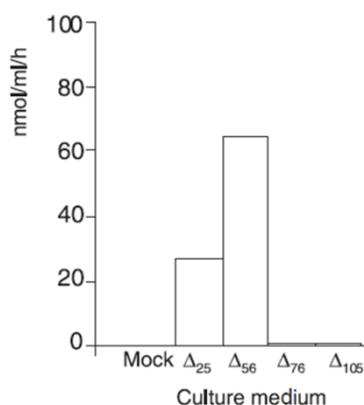


Figure 47. Activité des sialyltransférases dans le milieu de culture avec différentes formes tronquées de ST3GAL1. Les milieux de culture ont été collectés après 48 h de transfection, 20 μ L de milieu ont été incubés avec de l'acide sialique radiomarqué et du Gal β 1-3GalNAc-O-Bn comme substrat accepteur. Tiré de (Vallejo-Ruiz et al., 2001).

Nous avons suivi la même stratégie pour l'enzyme humaine ST6GAL1. Plusieurs constructions ont été réalisées pour produire une enzyme tronquée des 27, 37, 56, 73, 89 ou 107 premiers acides aminés (Δ 27ST6GAL1, Δ 37ST6GAL1, Δ 56ST6GAL1, Δ 73ST6GAL1, Δ 89ST6GAL1 et Δ 107ST6GAL1). Ces sites de troncation de la ST6GAL1 humaine ont été déterminés par l'analyse d'alignement multiple des séquences de ST6GAL1 de vertébrés et au vu des études précédentes décrites dans le chapitre introductif (Donadio et al., 2003; Kuhn et al., 2013; Legaigneur et al., 2001). Nous avons constaté que les constructions possédant au moins 73 acides aminés délévés sont les plus sécrétées dans le milieu de culture et semblent également plus exprimées dans la cellule (Figure 48).

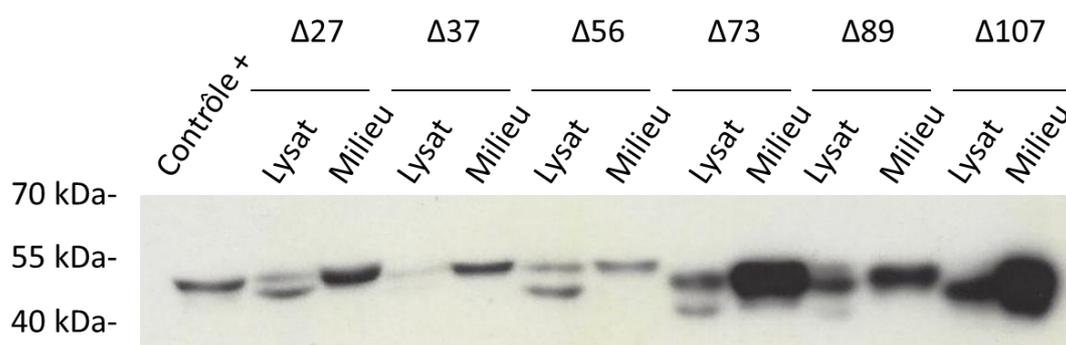


Figure 48. Analyse de l'expression des enzymes ST6GAL1 tronquées dans les lysats cellulaires et de leur sécrétion dans le milieu de culture après 36 h de transfection. Les lysats et les milieux de culture ont été soumis à un Western-blot en utilisant un anticorps anti-FLAG.

Les milieux de culture contenant les différentes enzymes tronquées recombinantes ont ensuite été utilisées pour déterminer l'activité enzymatique. Chacun de ces milieux a été incubé avec

l'asialoféruine et du CMP-Neu5Ac radioactif pour quantifier le transfert du substrat donneur sur la glycoprotéine. Les mutants délétés des 73 premiers acides aminés se sont montrés les plus actifs (Figure 49A) mais en reportant leur activité à la quantité d'enzyme utilisée estimée par analyse de Western-blot, ils ne sont pas montrés plus efficaces (Figure 49B). Comme décrit précédemment par Kuhn *et al.* en 2013, l'isoforme $\Delta 107$ ST6GAL1 pourtant largement produite s'est montrée totalement inactive (Kuhn *et al.*, 2013). Parmi les constructions que nous avons testées, nous avons choisi la $\Delta 56$ ST6GAL1 car elle présente une bonne activité enzymatique comparée à son niveau d'expression. En outre, cette construction a l'avantage de ne pas pouvoir être clivée par la protéase BACE1 qui coupe la protéine après le 40^{ème} acide aminé (Kitazume *et al.*, 2001). Des constructions présentant une troncature plus importante sont certes plus actives mais ont été montrés comme ayant une spécificité de reconnaissance du substrat accepteur modifiée (Legaigneur *et al.*, 2001; Luley-Goedl *et al.*, 2016).

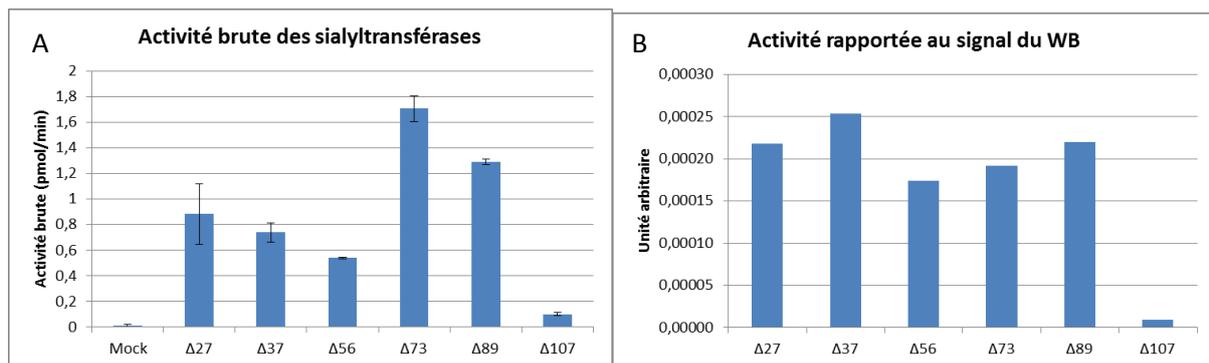


Figure 49. Activité brute (A) et relative à l'intensité du signal obtenue par Western-blot (B). Les milieux de culture contenant les différentes formes tronquées de ST6GAL1 ont été incubés avec 60 μ g d'asialoféruine, 100 μ M de CMP-Neu5Ac dont 100 000 DPM de CMP-[¹⁴C]Neu5Ac durant 6 heures. La radioactivité obtenue a ensuite été convertie en pmol/min (A) et rapportée au signal obtenu par Western-blot pour les formes tronquées (B).

Lors de nos travaux de recherche, nous avons été amenés à utiliser des formes pleine longueur de nos sialyltransférases. C'est pourquoi nous avons étudié l'influence du tampon RIPA sur l'extraction et l'activité protéique de cellules HEK293 transfectées transitoirement. Six tampons différents ont été utilisés :

- RIPA 1 : Tris HCl 10 mM ; NaCl 10 mM ; SDS 0,1% ; Triton X-100 1% ; Sodium deoxycholate 0,5% ; EDTA 1 mM ; pH 8
- RIPA 2 : Tris HCl 10 mM ; NaCl 10 mM ; Triton X-100 1% ; pH 8

- RIPA 3 : MES 100 mM ; Triton X-100 1% ; pH 6,4
- RIPA 4 : Tris HCl 10 mM ; NaCl 150 mM ; Triton X-100 1% ; pH 6,4
- RIPA 5 : Tris HCl 10 mM ; EDTA 1 mM ; NaCl 150 mM ; Triton X-100 1% ; Sodium deoxycholate 0,5% ; pH 7,4
- RIPA 6 (Tampon cacocylate) : Cacodylate de sodium 100 mM ; MnCl₂ 10 mM ; Triton X-100 0,2% ; pH 6,2

Ces tampons ont été utilisés pour extraire la $\Delta 27ST6GAL1$ de cellules HEK293 transfectées, les lysats ont ensuite été soumis à un Western-blot en utilisant un anticorps anti-FLAG. Les milieux de culture ont été utilisés en tant que témoin de transfection (Figure 50). Cette expérience n'a montré aucune différence entre les différents RIPA en termes d'extraction protéique.

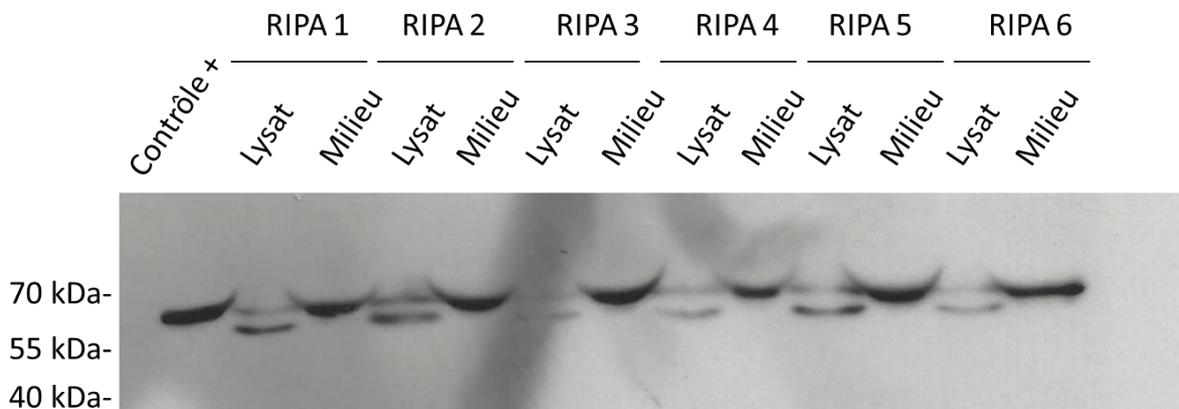


Figure 50. Evaluation de l'efficacité d'extraction protéique de différents tampons RIPA. Vingt microgrammes de protéines et 30 μ L de milieu de culture ont été soumis à un SDS-PAGE. L'enzyme recombinante $\Delta 27ST6GAL1$ est visualisée par western-blot grâce à un anticorps anti-FLAG.

Nous avons ensuite évalué l'impact de ces extractions avec différents RIPA sur l'activité enzymatique de la $\Delta 27ST6GAL1$. Les lysats cellulaires ont été incubés avec de l'asialofétuine et du CMP-Neu5Ac radioactif pendant 6 h (Figure 51). L'activité obtenue avec les différents milieux a été déduite d'un milieu issu de cellules non transfectées nommé mock. Une activité dans ce milieu indiquera que des enzymes sont naturellement sécrétées par les cellules ou alors présente dans le sérum de veau ajouté dans les milieux de culture. Cette expérience a montré que les sialyltransférases sont actives dans le milieu de culture et que leur activité est supérieure à celle du mock et que les tampons d'extraction RIPA 1 et 5 inhibent fortement l'activité enzymatique de notre sialyltransférase. Il est fort probable que le sodium deoxycholate commun aux 2 tampons soit impliqué dans cette inhibition. Nous avons ainsi choisi le RIPA 4 pour extraire nos protéines enzymatiques dans la suite de nos expériences de détermination d'activité enzymatique.

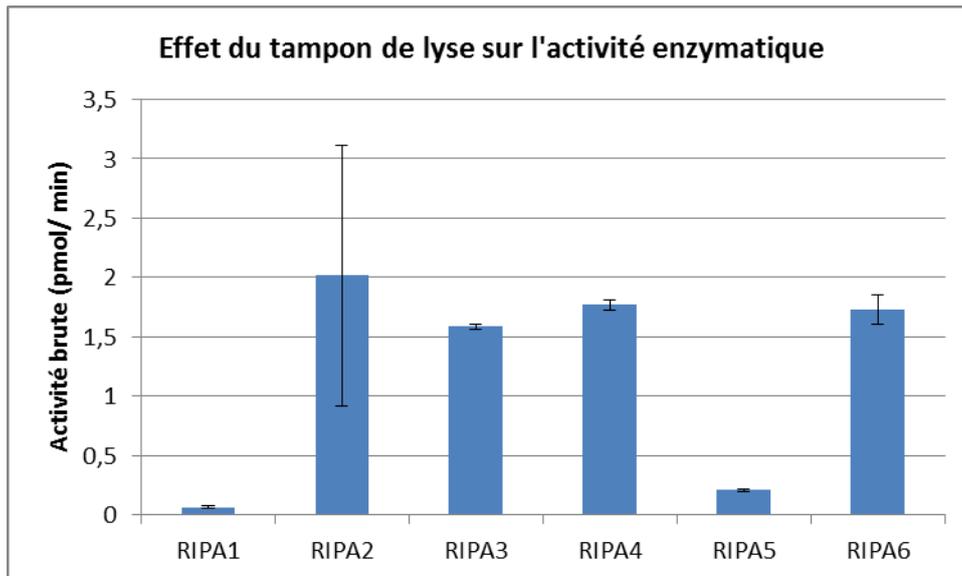


Figure 51. Effets de différents tampons RIPA sur l'activité enzymatique. Les cellules HEK293 transfectées pendant 36 h avec le plasmide permettant l'expression de la $\Delta 27ST6GAL1$ ont été lysées avec les différents tampons RIPA. Six μL de lysat ont ensuite été incubés pendant 6 h à 37°C avec 60 μg d'asialofétuine et 100 μM de CMP-Neu5Ac radioactif dont 100 000 DPM de CMP- ^{14}C Neu5Ac dans un volume final de 30 μL . La radioactivité a ensuite été comptabilisée et convertie en pmol/min.

Des essais ont été réalisés pour tenter de concentrer ces enzymes recombinantes produites dans le milieu de culture de cellules HEK293. Cette étape de purification avait également pour but de les séparer des protéines présentes dans le milieu de culture qui pourraient influencer la réaction de sialylation. Pour cela, nous avons incubé nos enzymes recombinantes avec un anticorps anti-FLAG que nous avons ensuite fixé sur des billes de sépharose (Figure 52A et B). Cependant, le rendement de cette opération est extrêmement faible (en particulier pour ST6GAL1) car une grande quantité d'enzymes est perdue dans les premières étapes de l'IP, notamment au moment du nettoyage du milieu par les billes de sépharose afin de retirer les composants qui pourraient générer un bruit de fond important en se liant de façon aspécifique aux billes durant l'IP (Figure 52A). Pour ST3GAL1, qui est en quantité relativement importante dans le milieu de culture, l'IP s'avère convenable malgré la perte importante de protéines. Par ailleurs, le poids moléculaire de ST6GAL1 est comparable au poids moléculaire de la chaîne lourde de l'anticorps anti-flag qui sort aux environs de 55 kDa rendant difficile la visualisation de ST6GAL1 sur Western-blot après l'IP (Figure 52B).

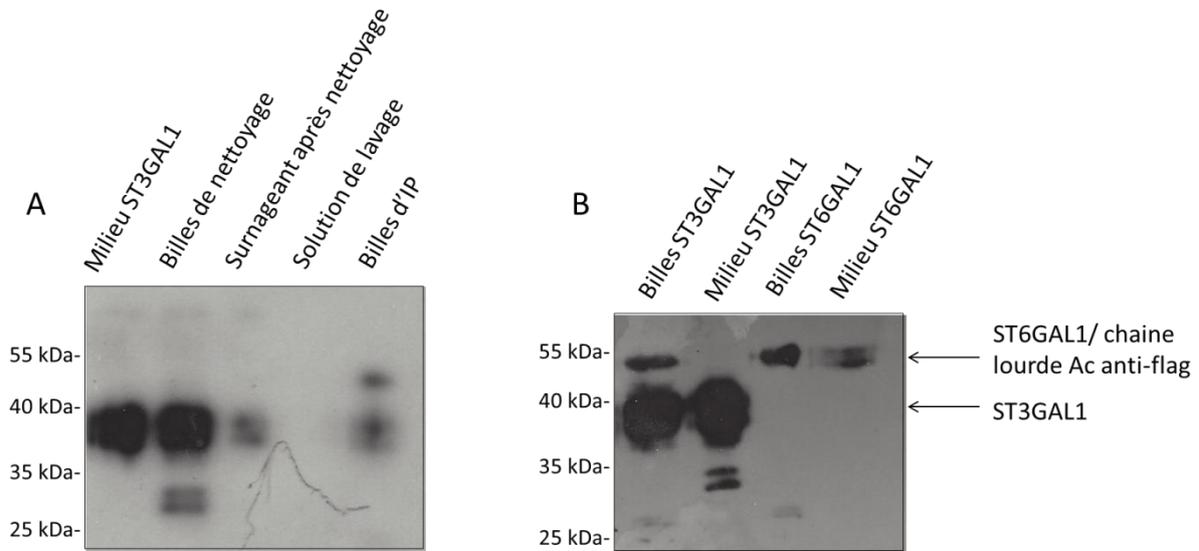


Figure 52. Présence de la ST3GAL1 au cours des différentes étapes de l'immunoprécipitation et comparaison avec ST6GAL1. A) Le milieu de culture contenant ST3GAL1 a été nettoyé avec des billes de sépharose afin de retirer tous les éléments susceptibles de se lier aux billes de façon non spécifique durant l'IP. Le surnageant issu du nettoyage a ensuite été incubé avec l'anticorps anti-flag puis avec de nouvelles billes de sépharose. Les billes ont ensuite été lavées et l'ensemble des milieux a été soumis à un SDS-PAGE et Western-blot en utilisant un anticorps anti-FLAG. B) Immunoprécipitation des enzymes recombinantes sur billes. Le milieu de culture contenant ST3GAL1 ou ST6GAL1 a été soumis en suivant le protocole d'IP. Les billes portant les enzymes immunoprécipitées ont ensuite été soumises à un Western-blot en utilisant un anticorps anti-FLAG.

Nous avons ensuite déterminé si nous pouvions détecter une activité enzymatique avec les enzymes immunoprécipitées. Dans le souci d'étudier de façon simple et rapide l'activité de nos sialyltransférases, nous avons utilisé le « sialyltransferase activity kit » vendu par la société R&D systems. Après l'étape de sialylation réalisée par les sialyltransférases immunoprécipitées, le CMP libéré est dosé indirectement *via* la quantité de phosphate issu de l'action d'une phosphatase clivant la liaison entre le phosphate et la cytidine. Le phosphate ainsi libéré va réagir avec du vert de malachite pour former un composé coloré dont l'absorbance est mesurée à 620 nm.

Nous avons incubé les billes issues de la précipitation avec un milieu de culture contenant ST6GAL1 ou ST3GAL1 ou un milieu mock. L'activité du milieu mock a ensuite été déduite de l'activité obtenue par l'activité des sialyltransférases immunoprécipitées. Comme attendu, l'activité de ST6GAL1 est très faible comparée à celle de ST3GAL1 car elle est beaucoup moins présente sur les billes (Figure 53A). L'augmentation de la concentration en CMP-Neu5Ac, réalisée afin d'augmenter les probabilités de rencontre entre la sialyltransférase et ses 2 substrats, n'a également pas non plus mis en évidence d'activité nette (Figure 53B). L'enzyme ST3GAL1 peut être utilisée sur billes mais la détermination de

son activité diminue avec le temps probablement parce que l'activité enzymatique de ST3GAL1 dans les temps courts est supérieure à l'hydrolyse du CMP-Neu5Ac alors qu'à des temps plus longs la différence est moins importante.

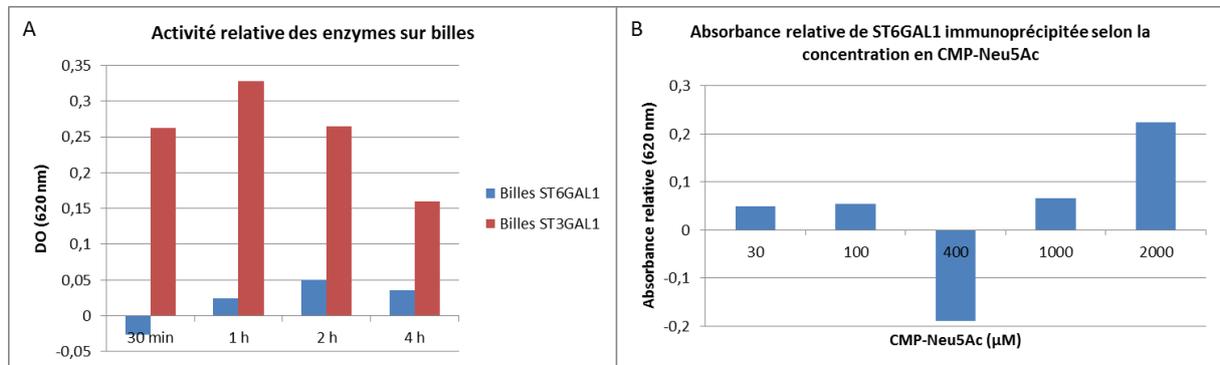


Figure 53. Activité relative des enzymes sur billes. A) L'activité de ST6GAL1 et ST3GAL1 immunoprécipitées a été déduite de l'activité de billes incubées avec le milieu mock sur différents temps (30 min, 1 h, 2 h et 4 h). B) L'activité de ST6GAL1 immunoprécipitée a été déduite de celle issue de billes mock avec différentes concentrations en CMP-Neu5Ac (30, 100, 400, 1000 et 2000 μM). N=1.

Le kit permet de visualiser l'activité de la ST3GAL1 immunoprécipitée et montre que son activité est réduite au cours du temps ce qui est étrange car on s'attendrait à atteindre un plateau plutôt qu'à visualiser une activité décroissante avec le temps. C'est pourquoi nous avons procédé à quelques essais pour déterminer les limites de ce test. Ce test est basé sur la détection de phosphate dans la solution nous avons donc cherché à déterminer les différentes sources possédant cette molécule. Comme premier essai, nous avons voulu mesurer l'absorbance de base du substrat accepteur et du milieu de culture seul afin de vérifier s'il contenait du phosphate. Après une incubation de 30 min à 37°C avec la phosphatase et 100 μg d'asialofétuine ou 25 μL de milieu de culture, le vert de malachite a été ajouté et l'absorbance quantifiée à 620 nm (Figure 54A). Cette expérience a démontré que la solution contenant le substrat accepteur possédait des molécules de phosphate, ce qui crée un bruit de fond. Le niveau de la DO est relativement au même niveau que la solution contrôle avec 100 μM de CMP. Il serait nécessaire de procéder à des étapes de séparation pour purifier le substrat accepteur. En ce concerne le milieu de culture, l'absorbance est probablement au niveau de saturation laissant penser que le milieu de culture est rempli de phosphate compliquant l'analyse biochimique de sialyltransférases non purifiées (Figure 54A).

Nous avons réalisé une deuxième expérience en utilisant différentes concentrations en CMP-Neu5Ac commercial dilué dans le tampon et avons directement réalisé la révélation avec la phosphatase et le vert de malachite. Cette expérience nous a démontré que plus la quantité initiale d'acide sialique

activé est importante et plus la DO augmente et ce, de façon proportionnel (Figure 54B). Cette expérience montre que le CMP-Neu5Ac commercial est déjà fortement hydrolysé, ce qui gênera la visualisation de l'activité enzymatique et est probablement l'explication concernant la baisse d'absorbance relative de la ST3GAL1 immunoprécipitée au cours du temps. En effet, le graphique montre la différence d'absorbance entre la condition avec l'enzyme immunoprécipitée et une condition avec des billes mock. Si l'hydrolyse du CMP-Neu5Ac augmente avec le temps d'incubation, la différence entre les 2 conditions est réduite et se traduit en une baisse apparente de l'activité de l'enzyme, ce qui est un inconvénient dans la détermination de cinétique. En résumé, l'utilisation de ce kit n'est pas possible lorsque les enzymes sont dans un environnement possédant du phosphate ce qui nécessite une étape de purification des enzymes recombinantes. Cependant, pour réaliser cette étape il faut que la production en enzyme dans le milieu de culture soit suffisante, ce qui est long, contraignant et variable selon l'enzyme. C'est pourquoi l'immunoprécipitation et le kit ne seront plus utilisés dans la suite de cette étude.

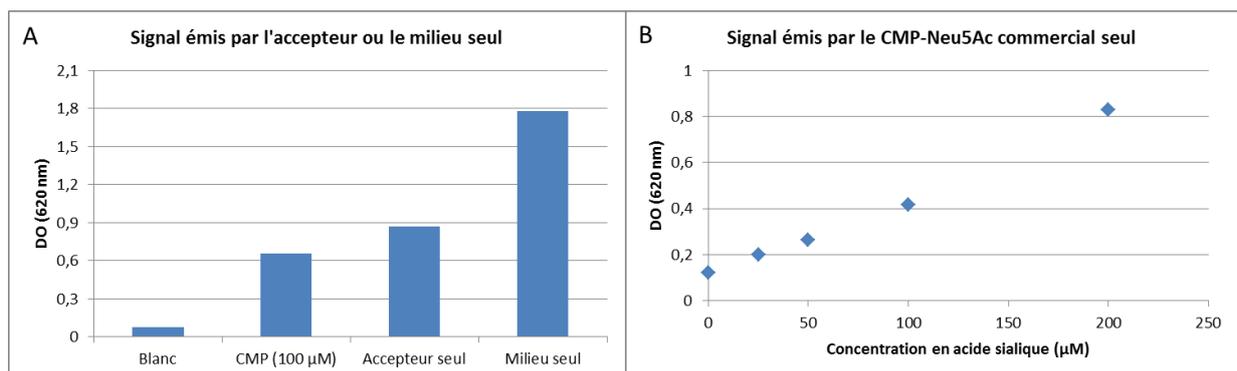


Figure 54. Détermination de la présence de phosphate au sein de différents réactifs utilisés pour la réaction de sialylation par le kit de R&D. A) Détermination de la présence de phosphate au sein de 50 µL de tampon de la phosphatase (blanc), de CMP à 100 µM, 60 µg d'asialofétuine et du milieu de culture. B) Signal émis avec différentes concentrations en CMP-Neu5Ac commercial (Sigma).

L'ensemble de ces étapes préliminaires de mise au point de la production d'enzymes recombinantes et de nos essais enzymatiques sont primordiales pour évaluer correctement l'activité enzymatique de nos sialyltransférases. Ainsi, pour la suite de nos expériences, nous avons choisi d'utiliser les constructions moléculaires permettant l'expression des $\Delta 56ST6GAL1$ et $\Delta 56ST3GAL1$ humaines et nous utiliserons les milieux de culture de cellules transfectées après 36 h. Un Western-blot avec un anticorps anti-FLAG montre que ces conditions sont satisfaisantes pour obtenir des enzymes sécrétées dans le milieu de culture (figure 55).

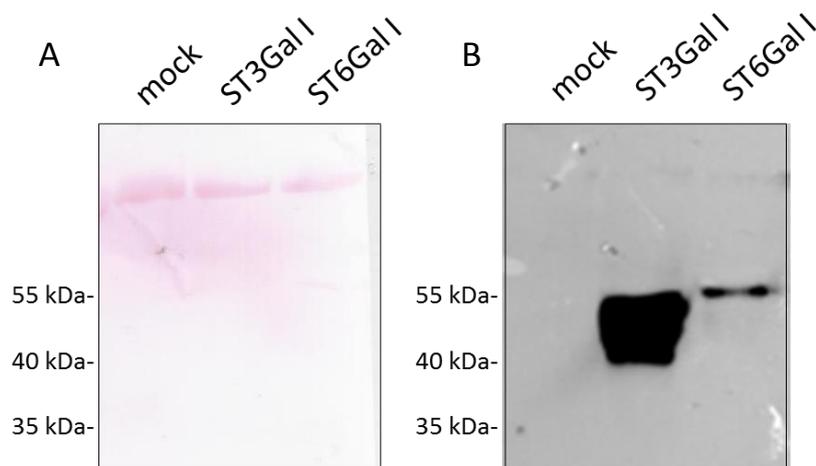


Figure 55. Western-blot des milieux de culture des cellules transfectées. Les cellules HEK293 ont été transfectées soit avec un plasmide vide (mock), soit un plasmide permettant l'expression de la $\Delta 56$ ST3GAL1 ou de la $\Delta 56$ ST6GAL1. Les milieux de culture ont ensuite été récupérés et soumis à un SDS-PAGE, l'efficacité du transfert et l'équicharge ont été vérifiées par rouge Ponceau (A) puis à un Western-blot avec l'utilisation d'un anticorps anti-Flag (B). La forme soluble non glycosylée de ST3GAL1 avec le peptide 3xFLAG est attendue à 34,98 kDa alors que ST6GAL1 est attendue à 42,67 kDa. Tiré de Noel et al. 2017.

Nous avons constaté de façon récurrente une différence de quantité d'enzyme produite dans les milieux de culture, l'isoforme $\Delta 56$ ST6GAL1 étant bien moins produite dans le milieu de culture que l'isoforme $\Delta 56$ ST3GAL1. Un Western-blot réalisé avec les lysats cellulaires montrent que l'expression de ST6GAL1 pleine taille dans les cellules est également inférieure laissant sous-entendre que ce n'est pas un problème de sécrétion mais bien d'expression de la séquence codante (données non montrées).

Nous avons ensuite contrôlé l'état de glycosylation de nos enzymes recombinantes $\Delta 56$ ST6GAL1 et $\Delta 56$ ST3GAL1 car l'état de glycosylation influence l'activité des sialyltransférases (Fast, 1990). Une analyse bio-informatique *via* les outils de la base de données ExPasy nous informe que les formes pleine longueur et tronquée de ST6GAL1 possèdent 2 *N*-glycannes (Asn149 et Asn161). Concernant la ST3GAL1, la forme pleine taille possède 5 *N*-glycannes alors que la forme tronquée $\Delta 56$ ST3GAL1 n'en possède que 4. Un traitement à la PNGase F, une glycosidase permettant le retrait des *N*-glycannes des glycoprotéines, nous a permis de visualiser l'état de glycosylation de nos enzymes recombinantes (Figure 56). Sur ce Western-blot, nous distinguons différentes glycoformes de la $\Delta 56$ ST6Gal1 et de la $\Delta 56$ ST3GAL1 dont le poids moléculaire est augmenté selon l'état de maturation des *N*-glycannes selon que l'enzyme est présente au début ou à la fin de la voie de sécrétion. En effet, dans le milieu

de culture nous retrouvons une enzyme dont le poids moléculaire est plus important que dans les lysats signifiant que l'enzyme possède tous ses *N*-glycannes entièrement glycosylés. L'utilisation de la PNGase F montre que ST6GAL1 et ST3GAL1 portent des *N*-glycannes car son action induit une baisse du poids moléculaire.

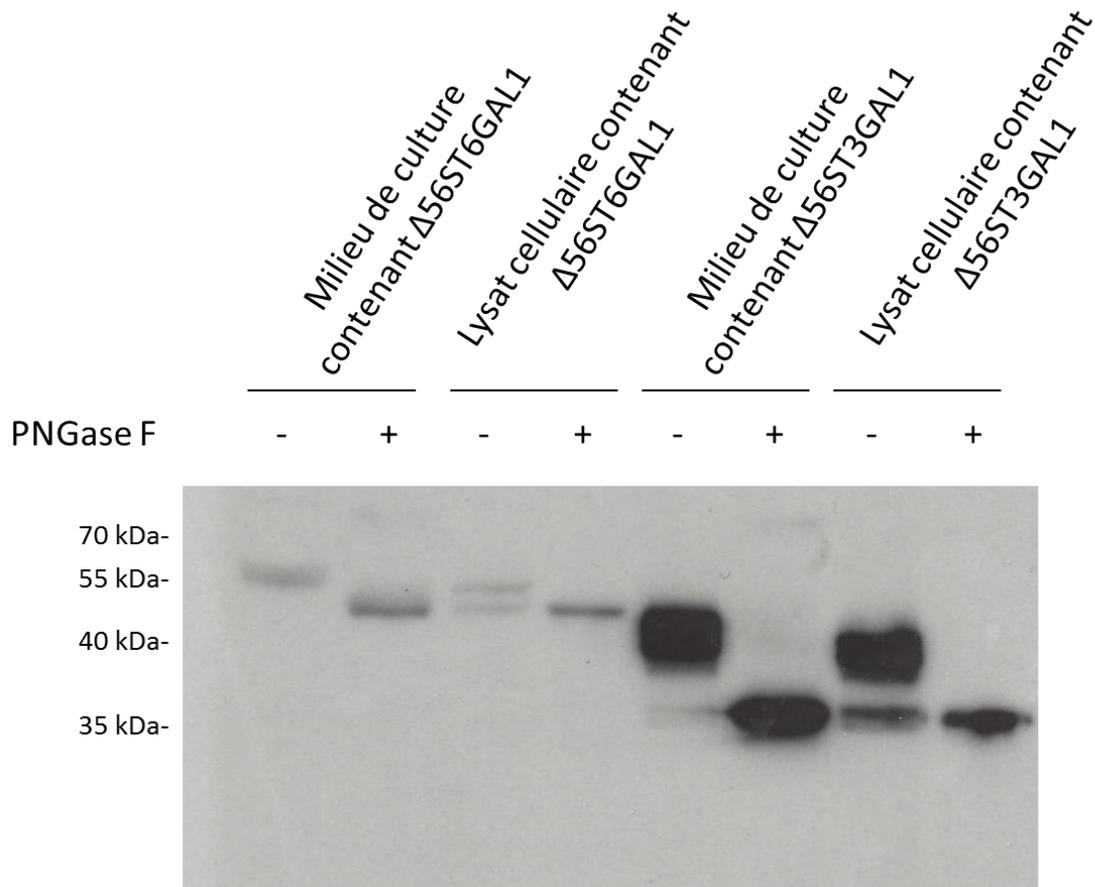


Figure 56. Western blot de $\Delta 56\text{ST6GAL1}$ et $\Delta 56\text{ST3GAL1}$ avec ou sans traitement à la PNGase F. Les lysats des cellules transfectées ainsi que les milieux de culture contenant les protéines recombinantes $\Delta 56\text{ST6GAL1}$ et $\Delta 56\text{ST3GAL1}$ ont été soumis à une digestion à la PNGase F afin de cliver la liaison entre les *N*-glycannes et l'asparagine. Par la suite ces protéines ont été soumises à une migration en SDS-PAGE et à un Western-blot en utilisant un anticorps anti-FLAG.

II. Etude de l'implication d'un acide aminé conservé au cours de l'évolution sur les propriétés de ST3GAL1.

La mise au point de ces outils moléculaires ($\Delta 56\text{ST6GAL1}$ et $\Delta 56\text{ST3GAL1}$) et des conditions optimales pour leur utilisation a trouvé une première application dans l'étude de la relation structure-fonction de la ST3GAL1 humaine. Des analyses détaillées de l'évolution moléculaire des

membres de la famille des ST3GAL, à laquelle appartient les ST3GAL1 de vertébrés ont montré que certains acides aminés de leur séquence protéique sont conservés au cours de l'évolution ou encore co-évoluent entre eux (Petit et al., 2015). Ces acides aminés conservés ont bien souvent un rôle critique dans la structuration de la protéine, dans les interactions de l'enzyme avec d'autres protéines et finalement dans son organisation fonctionnelle. C'est pourquoi une mutation sur ces positions conservées peut entraîner la production d'une protéine inactive ou mal conformée qui n'atteindra pas son organite cible. La compréhension de cette relation structure-fonction revêt donc une importance considérable pour comprendre comment fonctionne l'enzyme et expliquer les pathologies de glycosylation associées à des structures protéiques anormales. Des analyses bio-informatiques d'alignement multiple des séquences de ST3GAL ont permis de mettre en évidence un réseau d'acides aminés conservés et co-évolués dont un résidu de glycine en 288^{ème} position dans la séquence humaine de ST3GAL1 (G291 dans la figure 57A et B). Cet acide aminé se trouve à la jonction du sialylmotif S et du motif de famille c (figure 57C).

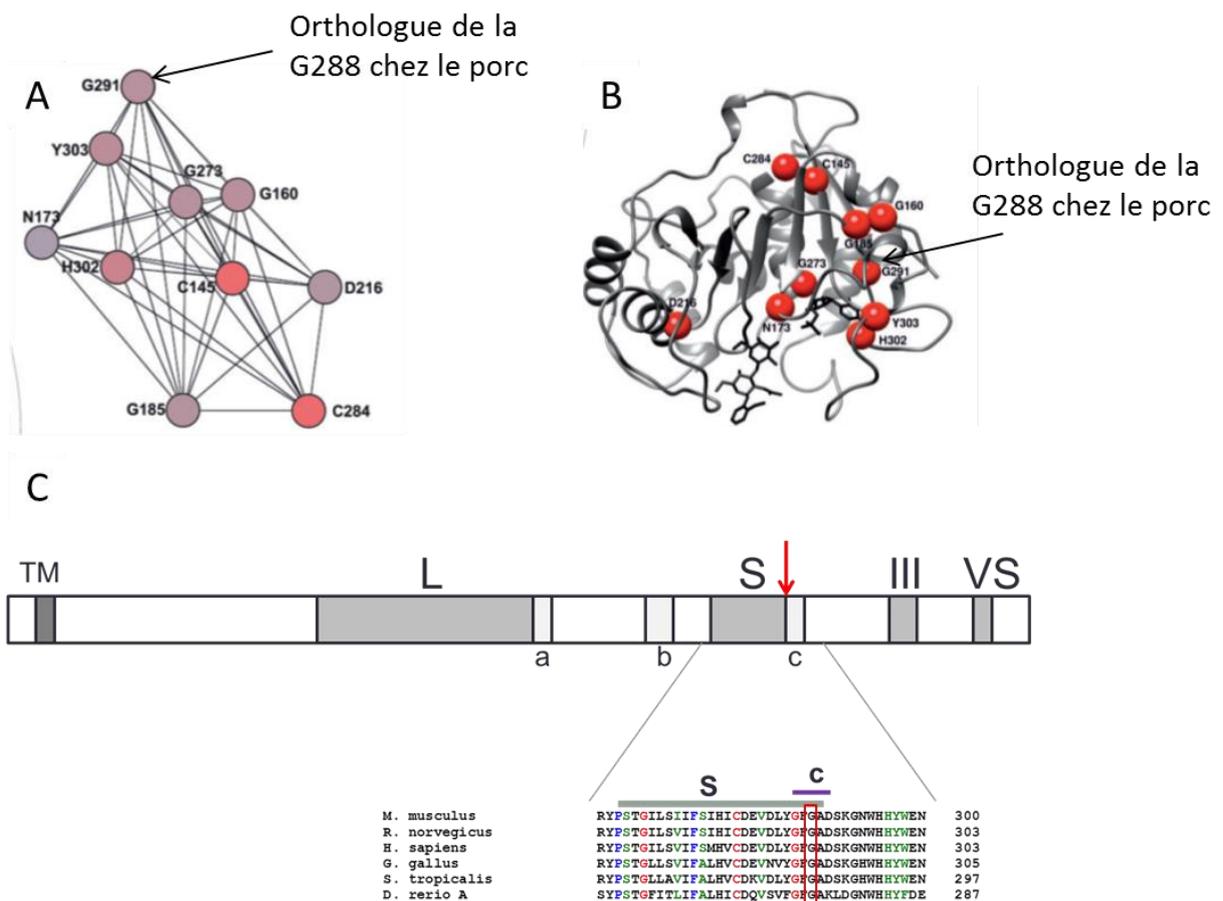


Figure 57. Localisation de SDP dans la structure de ST3GAL1 de co-évolution avec d'autres acides aminés. A) Schéma de ST3GAL1 comportant les différents domaines et motifs importants comme la queue cytoplasmique et le domaine transmembranaire ainsi que les sialylmotifs L, S, III et VS et les motifs de famille a, b et c présents dans le domaine catalytique. La séquence en acides aminés du sialylmotif S et du motif de famille c sont représentés en bas afin de visualiser la position de la glycine en position 288 commune aux 2 motifs (encadré rouge). B) Réseau d'acides aminés co-évolués des ST3GAL établi sur le serveur MISTIC. Les boules représentent les résidus d'acides aminés et les lignes entre les boules les scores significatifs d'information mutuelle. C) Position des acides aminés co-évolués sur la structure référence de ST3GAL1 de porc (PDB : 2WNB). Tiré de Petit et al. 2015.

Par ailleurs, il a été déterminé dans l'équipe du Dr. Mathieu Lemaire (Canada) une anomalie génétique dans la séquence de ST3GAL1 lors d'une néphropathie particulière nommée atypical hemolytic uremic syndrome (aHUS) où la glycine en position 288 chez cette enzyme est mutée en acide aspartique. Chez l'enfant, ce syndrome se caractérise par une anémie, dûe à la destruction des globules rouges, une insuffisance rénale et une faible quantité de plaquette (données non publiées). Nous avons donc procédé à la caractérisation biochimique de cette déficience. Pour étudier le rôle joué par cet acide aminé dans l'enzyme ST3GAL1 visiblement important au niveau de son évolution moléculaire et de l'organisme humain, nous avons construit différents plasmides pour l'expression de différentes isoformes mutées de ST3GAL1.

Pour étudier l'activité enzymatique de ces isoformes mutées de ST3GAL1, nous avons réalisé la construction moléculaire de 4 isoformes étiquetées par un FLAG coté *N*-terminal de l'enzyme, 2 pour l'expression de formes mutées de l'enzyme ST3GAL1 pleine longueur (G288D et G288A) dans la cellule HEK293 transfectée transitoirement et 2 constructions pour l'expression de formes mutées (G288D et G288A) et tronquées de l'enzyme (Δ 56ST3GAL1) dans le milieu de culture de cellule HEK293 transfectées transitoirement. Nous avons aussi utilisé comme contrôles, un plasmide vide (mock) et un plasmide avec la forme non mutée de l'enzyme tronquée (Δ 56ST3GAL1) ou non. Un suivi par Western Blot et utilisation d'un anticorps anti-FLAG de la production de ces différentes isoformes dans la cellule 36 heures post-transfection et dans leur milieu de culture nous a montré que toutes les isoformes mutées en G288 de la Δ 56ST6GAL1 sont produites dans la cellule et ne sont plus sécrétées dans le milieu de culture (Figure 58).

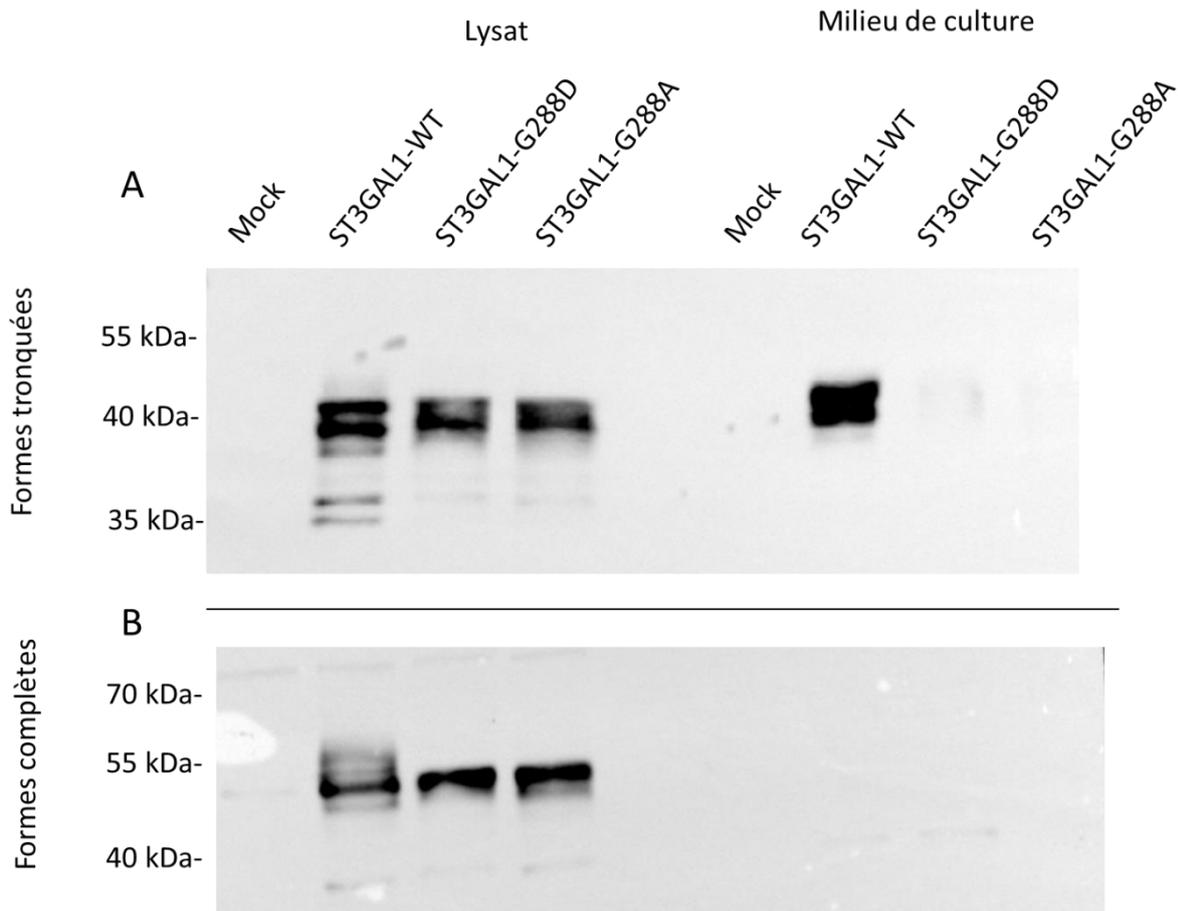


Figure 58. Western blot des formes tronquées (A) et complètes (B) des formes WT, mutantes G288D et G288A. Vingt μg de protéines ou 20 μL de milieu de culture ont été soumis à Western-blot en utilisant un anticorps anti-FLAG.

Toutes les protéines recombinantes mutées de l'enzyme se trouvent donc dans le lysat cellulaire, ce qui montre que la mutation G288 n'empêche pas la production de l'enzyme dans la cellule. Par ailleurs, toutes les isoformes semblent glycosylées au même niveau et il ne semble pas qu'une construction soit plus dégradée qu'une autre car l'intensité des bandes est comparable entre chaque isoformes. Cependant, au niveau des formes tronquées, seule la forme native de l'enzyme $\Delta 56\text{ST3GAL1}$ est sécrétée dans le milieu de culture ce qui suggère que la glycine 288 est fondamentale pour la sécrétion de l'enzyme.

Pour étudier plus en profondeur l'impact de cette mutation sur l'enzyme, nous avons analysé l'activité enzymatique des isoformes de ST3GAL1 produites dans la cellule. Des lysats des cellules transfectées ont été obtenus avec le tampon d'extraction RIPA 4. Ces différentes sources enzymatiques ont été incubées avec de l'asialofétuine et du $\text{CMP-}^{14}\text{C}\text{Neu5Ac}$ pour une réaction de sialylation de 6 heures. Puis, la radioactivité associée à l'asialofétuine a été comptée (Figure 59). Les

résultats obtenus montrent que les isoformes mutées de ST3GAL1 ne sont pas actives contrairement à la forme native de l'enzyme prouvant que la glycine 288 est aussi importante pour l'activité enzymatique.

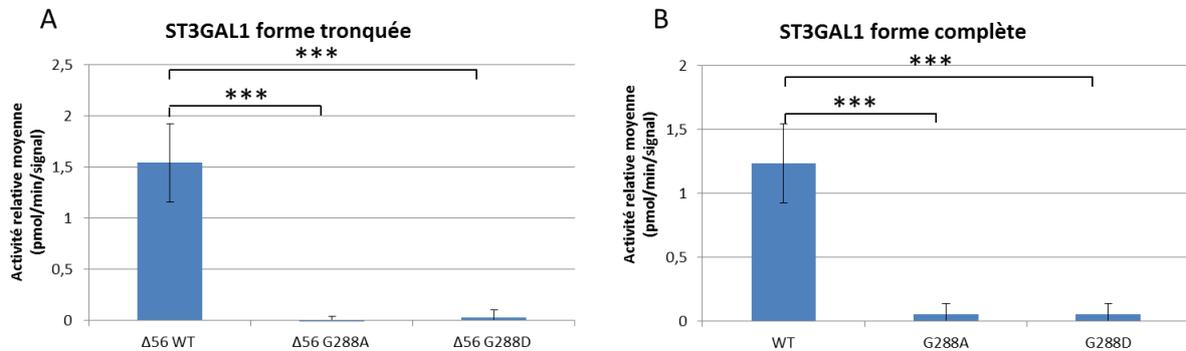


Figure 59. Activité relative des différentes formes tronquées et complètes de ST3GAL1 dans les lysats cellulaires. A) Les formes tronquées des enzymes ont été incubées avec 60 µg d'asialofétuine et 100 µM de CMP-Neu5Ac donc 50 000 DPM de CMP-[¹⁴C]Neu5Ac. Après 6 h d'incubation, la radioactivité associée à l'asialofétuine a été comptabilisée. B) Les formes tronquées des enzymes ont été incubées avec 60 µg d'asialofétuine et 100 µM de CMP-Neu5Ac donc 50 000 DPM de CMP-[¹⁴C]Neu5Ac. Après 6 h d'incubation, la radioactivité associée à l'asialofétuine a été comptabilisée. N=3, p-value = 0.0001.

Par la suite nous nous sommes intéressés à la localisation sub-cellulaire des différentes isoformes. Nous avons également réalisé une construction pour l'expression d'une enzyme mutée (G288A et G288D) ou non, pleine longueur associée à une étiquette mCherry coté *N*-terminal de la protéine. Ces différentes constructions ont été transfectées dans des cellules HeLa. Ces cellules sont un modèle cellulaire utilisé fréquemment dans les approches de microscopie confocale et les études de localisation subcellulaire de glycosyltransférases golgiennes. Par la suite, nous avons voulu déterminer la position subcellulaire des différentes formes de l'enzyme pour savoir si la glycine peut influencer la structure de l'enzyme et donc l'empêcher d'atteindre l'appareil de Golgi. Nous avons transfecté des cellules HeLa et avons réalisé un marquage de TMEM165, une protéine localisée dans le trans-golgi et impliquée dans l'antiport du Ca²⁺/ Mn²⁺ (Foulquier et al., 2012; Houdou et al., 2018), et de la calnexine, un marqueur réticulaire (Figure 60).

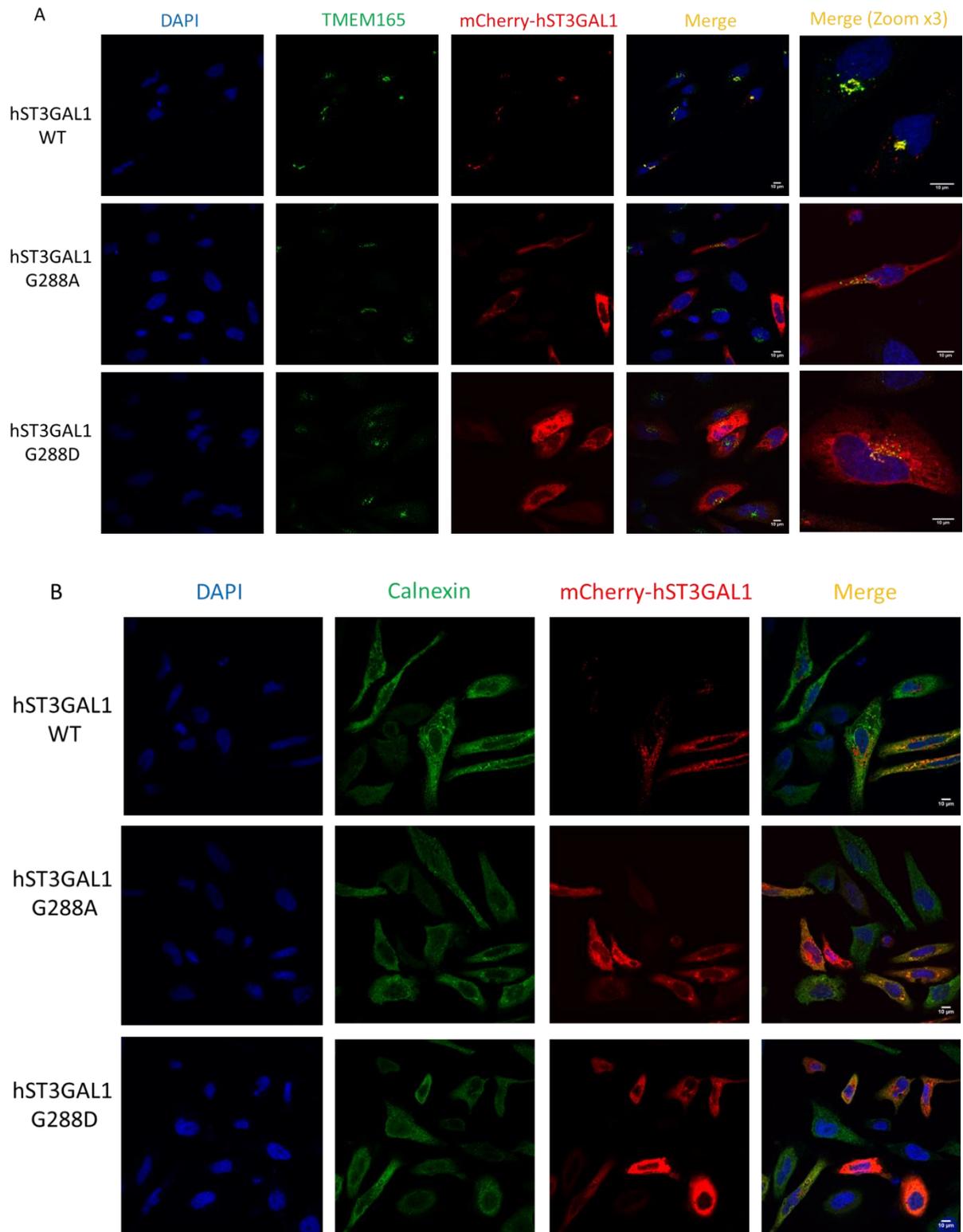


Figure 60. Localisation sub-cellulaire des différentes formes mutantes de ST3GAL1. Microscopie confocale de cellules HeLa transfectées avec les différentes constructions mCherryST3GAL1 et comarquées avec un marqueur Golgien TMEM165 (A) et un marqueur réticulaire (calnexine ; B).

Cette expérience montre que la forme native de la ST3GAL1 pleine longueur co-localise avec le marqueur trans-golgien contrairement aux 2 isoformes mutées qui co-localisent avec le marqueur réticulaire. La conclusion la plus probable de ces expériences est que la glycine 288 est impliquée dans le repliement de la protéine ce qui explique la présence dans le réticulum endoplasmique de l'isoforme mutée de l'enzyme. Une analyse de la structure 3D de l'enzyme ST3GAL1 de porc (*Sus scrofa*) grâce au logiciel PyMOL nous permet d'observer que cette glycine se trouve juste à côté du disaccharide accepteur et juste après un feuillet β (Rao et al., 2009) (Figure 61). Ces éléments tendent à confirmer que cette glycine est importante au niveau de la structure de la protéine et de la reconnaissance du substrat. Par ailleurs, cette expérience montre que le Tag mCherry n'a pas d'influence sur la localisation de la forme sauvage de l'enzyme.

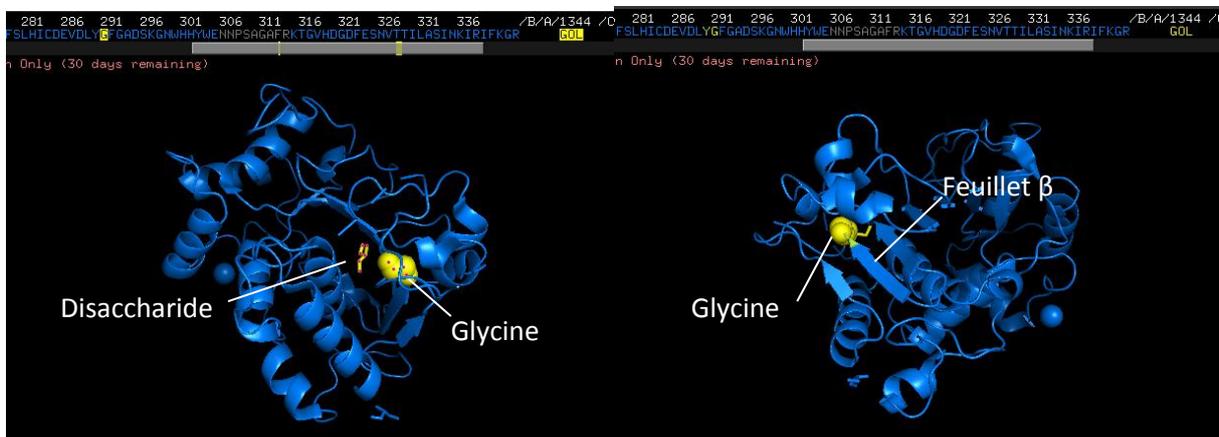


Figure 61. Représentation structurale de la ST3GAL1 de porc (*Sus scrofa*) (PDB : 2WNB) avec identification de la glycine (boule jaune), du disaccharide accepteur (molécule jaune) et du feuillet β adjacent grâce au logiciel PyMOL.

Pour conclure, les différents outils mis au point nous ont permis d'étudier l'impact de la mutation d'un acide aminé conservé et au cœur d'un réseau d'acides aminés co-évolués. Cet acide aminé est impliqué dans la structure, la localisation subcellulaire et l'activité enzymatique de ST3GAL1. Sa mutation, observée dans la pathologie néphrotique du syndrome hémolytique et urémique de l'enfant, empêche l'enzyme d'être présente et active au sein de l'appareil de Golgi.

III. Synthèse d'un acide sialique non naturel : le CMP-SiaNAI, utilisation par les sialyltransférases et applications

A. Synthèse du CMP-SiaNAI

Nous avons vu dans le chapitre introductif que les approches permettant l'étude des réactions de sialylation et le suivi des glycanes sialylés sont nombreuses mais qu'elles possèdent très rarement la possibilité de marquer sélectivement les *N*- ou les *O*-glycanes des glycoprotéines. Pour mettre au point une telle approche, nous avons utilisé ST6GAL1 et ST3GAL1 délétées de leurs 56 premiers acides aminés et produites dans le milieu de culture de cellules HEK293 transitoirement transfectées. L'utilisation de molécules issues de la synthèse chimique est en plein essor pour le marquage métabolique et le suivi des glycoconjugués sialylés *in vitro* et *in vivo*. Nous avons voulu tirer parti de ces derniers développements pour l'étude des sialyltransférases.

A l'Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, l'équipe de Yann Guérardel a développé la synthèse d'acides sialiques non naturels. L'un de ces acides sialiques est le SiaNAI qui porte un groupement alcyne au lieu du groupement acétyle. L'introduction de ce petit groupement chimique non naturel sur un acide sialique est particulièrement intéressante car elle permet de réaliser des réactions de chimie click pour greffer des fluorophores et donc de repérer et visualiser les sialoglycoconjugués porteurs de cette molécule.

La synthèse chimio-enzymatique du SiaNAI débute par l'utilisation de l'acide 4-pentynoïque, incubé avec du *N*-hydroxysuccinimide et du dichlorométhane pour former du succinimidyl-4-pentynoate après une incubation de 3 h 30 à température ambiante. Ce dernier composé est ensuite lavé avec du KHSO_4 et séché. La deuxième étape consiste à incuber le succinimidyl-4-pentynoate avec la D-mannosamine sur la nuit à température ambiante pour former le ManNAI qui a été purifié sur colonne de silice. Après élimination des solvants, le ManNAI est sous forme poudreuse (Figure 62).

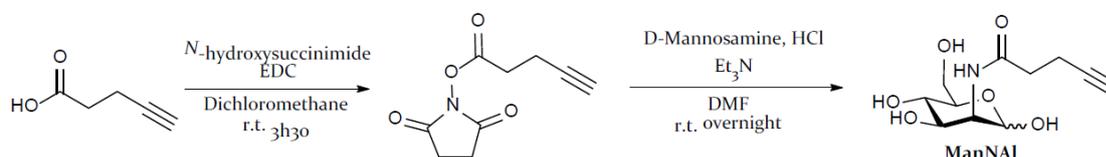


Figure 62. Etapes de synthèse chimique du ManNAI.

Le ManNAI est ensuite incubé avec la Neu5Ac aldolase d'*Escherichia coli* dans un tampon phosphate sur la nuit à 37°C pour former le SiaNAI (Figure 63). Celui-ci a été passé sur une résine échangeuse d'anions et purifié sur une colonne de gel filtration. Ces deux produits ManNAI et SiaNAI ont été

entièrement caractérisés par RMN du proton et du carbone, par infra-rouge et spectrométrie de masse (Gilormini et al., 2016b).

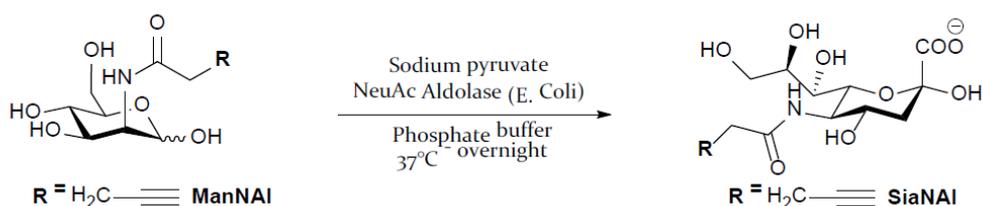


Figure 63. Etapes de synthèse du SiaNAI à partir du ManNAI.

Ces différents acide sialique (SiaNAI) ou précurseurs d'acide sialique (ManNAI) ont été utilisés avec succès comme rapporteurs dans des cellules de fibroblastes sains ou pathologiques (déficient en sialine, un transporteur d'acide sialique lysosomal) pour en élucider les mécanismes d'entrée (Gilormini et al., 2016a). Ces molécules s'avèrent être des outils précieux pour une meilleure compréhension et une bonne visualisation du métabolisme des acides sialiques.

Afin d'obtenir un acide sialique activé, directement utilisable par nos sialyltransférases recombinantes dans nos essais enzymatiques, le SiaNAI a ensuite été activé par l'utilisation de CTP et de l'enzyme CMP-acide sialique synthase (CMAS ou CSS de la bactérie *Neisseria meningitidis*), pour former le CMP-SiaNAI. Cette approche enzymatique présente l'avantage de pouvoir générer d'autres acides sialiques comme le CMP-Neu5Ac et le CMP-Neu5Gc car la Neu5Ac aldolase et la CSS ont une large tolérance envers ces différents substrats (Gilormini et al., 2016b) (Figure 64).

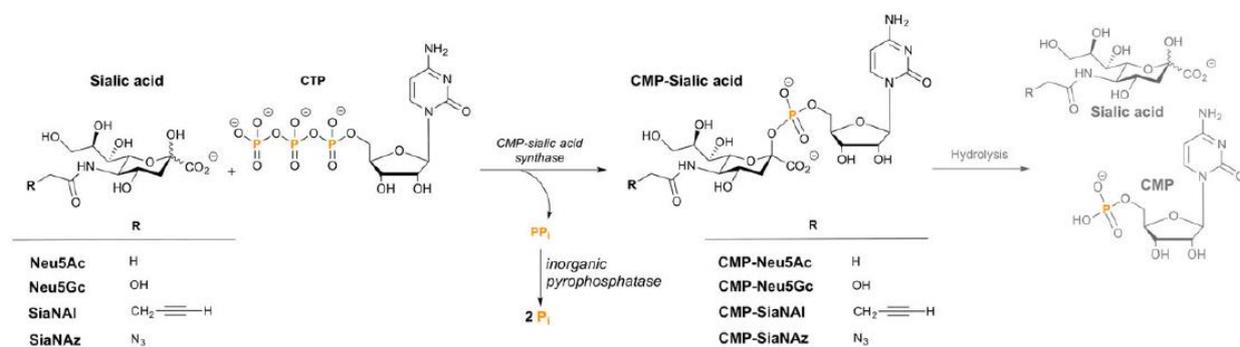


Figure 64. Synthèse du CMP-SiaNAI. Cette synthèse est réalisée en utilisant la CMAS de *Neisseria meningitidis* qui crée le CMP-SiaNAI et la pyrophosphatase inorganique de *Saccharomyces cerevisiae* qui hydrolyse le PPi en 2Pi afin d'éviter que la réaction inverse ne se produise. Tiré de (Gilormini et al., 2016b).

Pour éviter une formation reverse, la pyrophosphatase inorganique de *Saccharomyces cerevisiae* a été utilisée pour transformer le PPi en 2 Pi. Par ailleurs, la stabilité du composé a été mesurée par RMN du phosphore à différents temps. L'utilisation de cet élément pour la RMN a l'avantage de ne mettre en évidence que les composés porteurs de phosphore soit le CTP (chaque phosphore possède son propre signal car chacun possède un environnement différent qui influe sur le signal émis), le CMP, le CMP-Sia, le PPi et le Pi (Figure 65).

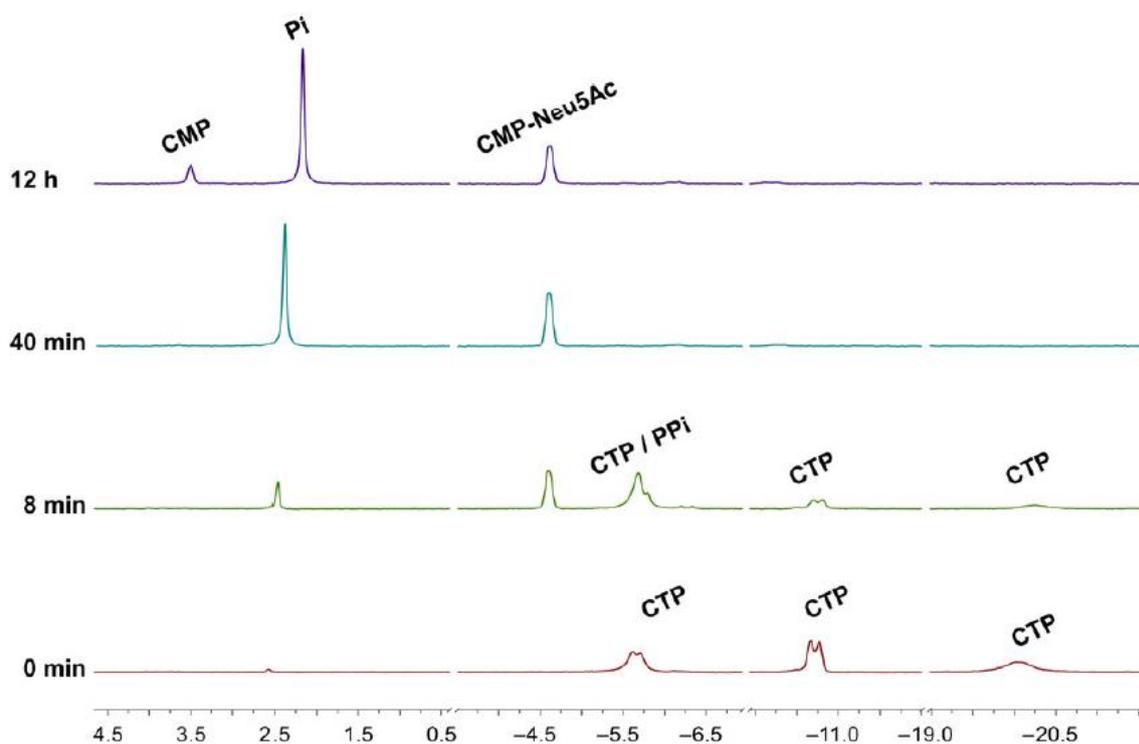


Figure 65. Spectres RMN lors de la synthèse du CMP-Neu5Ac à différents moments de l'incubation. Tiré de (Gilormini et al., 2016b).

Une méthode de suivi par RMN du phosphore ^{31}P de cette réaction de synthèse des acides sialiques activés sous forme de CMP-acide sialique a été mise au point dans l'équipe du Dr. Yann Guérardel et a permis de déterminer au point les conditions optimales pour l'obtention d'une réaction totale en s'affranchissant des étapes de purification.

Ma participation à ces travaux publiés en 2016 a été de démontrer que les sialyltransférases recombinantes $\Delta 56\text{ST6GAL1}$ et $\Delta 56\text{ST3GAL1}$ produites dans les milieux de culture des cellules HEK293 transfectées pouvaient utiliser ces composés (Gilormini et al., 2016b).

B. Utilisation du CMP-SiaNAI par ST3GAL1 et ST6GAL1

1. *In vitro*

Afin de confirmer que les enzymes tronquées présentes dans le milieu de culture utilisent le CMP-SiaNAI produit par l'équipe de Yann Guérardel (Gilormini et al., 2016b), celles-ci ont été incubées en présence de 100 μ M de CMP-SiaNAI comme substrat donneur et de la fétuine bovine désialylée (la glycoprotéine native est porteuse de 3 *N*-glycannes et 3 *O*-glycannes sialylés (Baenziger and Fiete, 1979; Spiro and Bhojroo, 1974). Cette fétuine a été désialylée par hydrolyse chimique en utilisant de l'acide tri-fluoroacétique une nuit à 80°C. Cette forme désialylée de la fétuine (asialofétuine) est utilisée en tant substrat accepteur pour l'activité de la Δ 56ST3GAL1. Après 4 h de sialylation à 37°C, la glycoprotéine a été soumise à une digestion (ou non) par la sialidase d'*Arthrobacter ureafaciens* qui clive toutes les liaisons glycosidiques engagées avec un résidu d'acide sialique (en α 2,3, α 2,6 ou α 2,8). Ces glycoprotéines ont ensuite subi la chimie-click (CuAAC) pour lier le SiaNAI transféré à une molécule de biotine-azoturée. Celle-ci a ensuite été soumise à un Western-blot en utilisant un anticorps anti-biotine couplé avec la HRP (Horse Radish Peroxidase) (Figure 66). Cette approche nous a permis de démontrer que la Δ 56ST3GAL1 est capable d'utiliser le CMP-SiaNAI et que le signal émis est bien dû au SiaNAI transféré.

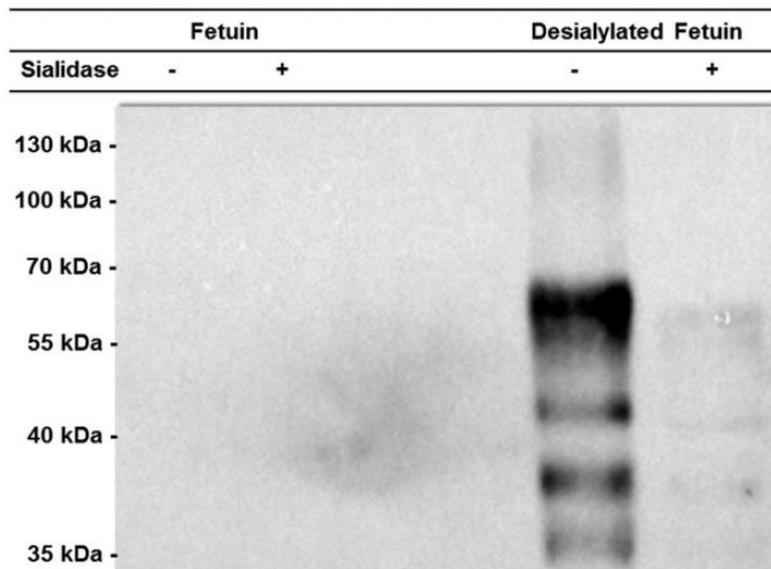


Figure 66. Sialylation de la fétuine désialylée (à droite) et non désialylée (à gauche) avec et sans digestion par la sialidase d'*Arthrobacter ureafaciens*. Tiré de Gilormini et al. 2016

Nous avons ensuite cherché à savoir si le CMP-SiaNAI pouvait être utilisé par nos sialyltransférases pour le marquage spécifique des *N*- et des *O*-glycannes de glycoprotéines (Gupta et al., 2016; Meng et al., 2013). Comme précédemment le CMP-SiaNAI a été utilisé comme substrat donneur, la fétuine désialylée ou non a été utilisée comme substrat accepteur pour l'activité des $\Delta 56$ ST6GAL1 et $\Delta 56$ ST3GAL1. Nous avons également utilisé l'asialo-orosomucoïde, une glycoprotéine porteuse de *N*-glycannes uniquement (Imre et al., 2008). Après une incubation de 4 h à 37°C, les glycoprotéines ont été clickées avec la biotine azoturée et soumises à un Western-blot en utilisant un anticorps anti-biotine couplé à la HRP (Figure 67A). Ce blot montre que ST6GAL1 et ST3GAL1 sont capables de sialyler l'asialofétuine et ST6GAL1 de sialyler l'asialoorosomucoïde mais pas la fétuine non désialylée. Une étape de digestion de l'asialofétuine resialylée par le SiaNAI avec la PNGase F, qui clive la liaison glycosidique entre le GlcNAc du *N*-glycanne et l'asparagine de la protéine, démontre le marquage sélectif des *N*-glycannes par la $\Delta 56$ ST6GAL1 et celui des *O*-glycannes par la $\Delta 56$ ST3GAL1 (Figure 67B). En outre, cette approche de Western-blot montre que le CMP-SiaNAI peut être utilisé pour déterminer la spécificité glycanique des sialyltransférases vis-à-vis de différentes glycoprotéines.

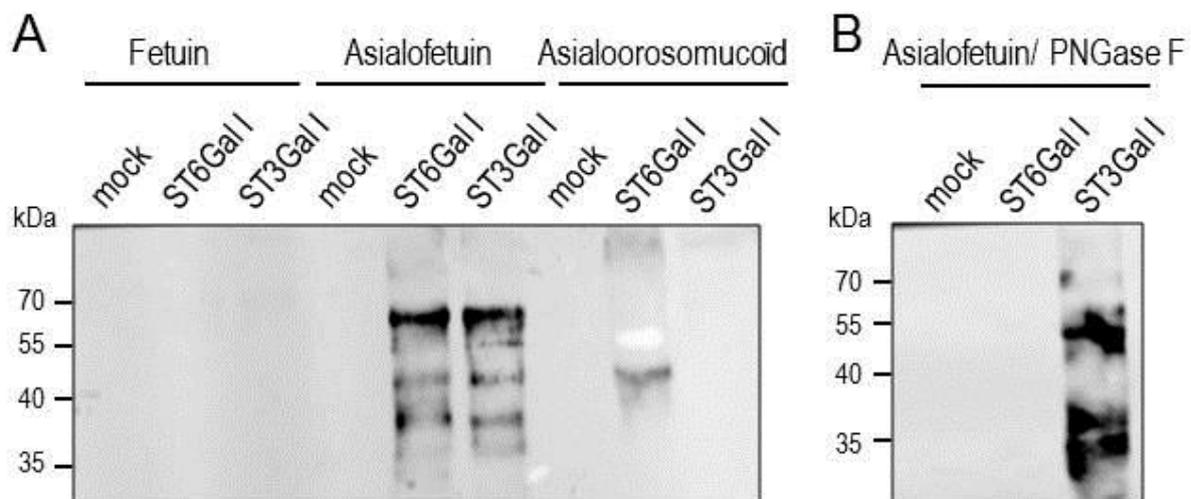


Figure 67. Western-Blot des substrats accepteurs sialylés par le CMP-SiaNAI avec les différents milieux de culture contenant les sialyltransférases. A) Les différents substrats accepteurs ont été soumis à une réaction de sialylation avec les différentes sialyltransférases et 100 μ M de CMP-SiaNAI pendant 4 h à 37°C. Le SiaNAI a ensuite été couplé à une azido-biotine. Après avoir été soumis à un SDS-PAGE puis à un Western-blot, la révélation de la biotine s'est faite par l'utilisation d'un anticorps anti-biotine. B) L'asialofétuine sialylée a été digérée par une PNGase juste après la réaction de sialylation pour séparer les *N*-glycannes de la protéine et soumise aux mêmes conditions que A. Tiré de (Gilormini et al., 2016b).

L'étape suivante a été de vérifier que nos sialyltransférases recombinantes utilisaient le CMP-SiaNAI de la même façon que le CMP-Neu5Ac. En effet, des études précédentes ont montré que l'ajout de groupements chimiques de type propionyle (un CH_2 supplémentaire) au niveau de la

chaîne *N*-acyle de l'acide sialique conduisait à une inhibition de l'activité de la polysialyltransférase ST8SIA2 (Horstkorte et al., 2004b) tout en stimulant la régénération axonale périphérique (Koulaxouzidis et al., 2015). Pour vérifier cette hypothèse, nous avons mesuré la constante d'affinité (K_m) vis-à-vis des 2 substrats donneurs CMP-Neu5Ac et CMP-SiaNAI. Pour le CMP-Neu5Ac, nous avons utilisé différentes concentrations en CMP-Neu5Ac froid et une quantité constante de CMP-[14 C]Neu5Ac utilisé comme traceur, avec de l'asialofétuine et nos 2 enzymes recombinantes. Après une incubation de 6 h la radioactivité associée à la glycoprotéine a été comptée et une courbe de type Michaelis-Menten a été tracée selon l'équation du même nom. Nous avons également utilisé un milieu de culture mock issu d'une transfection avec un plasmide vide pour soustraire l'activité endogène du milieu lors de nos calculs. Ainsi, nous avons déterminé un K_m vis-à-vis du CMP-Neu5Ac de $2.79 \pm 0.53 \mu\text{M}$ pour $\Delta 56\text{ST6GAL1}$ et de $41.23 \pm 7.64 \mu\text{M}$ pour $\Delta 56\text{ST3GAL1}$ (Figure 68A).

Pour déterminer un K_m de $\Delta 56\text{ST6GAL1}$ et $\Delta 56\text{ST3GAL1}$ vis-à-vis du CMP-SiaNAI, nous avons utilisé une approche de spectrométrie de masse pour l'analyse des acides sialiques transférés sur l'asialofétuine. Après une sialylation de 6 h avec différentes quantités de CMP-SiaNAI, la liaison glycosidique entre l'acide sialique transféré et le monosaccharide accepteur a été hydrolysée chimiquement à l'aide d'acide trifluoroacétique. Les acides sialiques ont ensuite été dérivés au DMB (1,2-diamino-4,5-méthylendioxybenzène) avant d'être analysés par LC-MS³ pour chaque concentration en CMP-SiaNAI utilisée. Nous avons ensuite tracé une courbe de type Michaelis-Menten et avons déterminé un K_m de $6,55 \pm 1,07 \mu\text{M}$ pour $\Delta 56\text{ST6GAL1}$ et de $49,03 \pm 9,91 \mu\text{M}$ pour $\Delta 56\text{ST3GAL1}$ vis-à-vis du CMP-SiaNAI (Figure 68B). Les K_m obtenus avec les 2 substrats donneurs sont du même ordre de grandeur pour la même enzyme, nous en avons conclu que ces dernières utilisaient avec la même affinité le CMP-Neu5Ac et le CMP-SiaNAI.

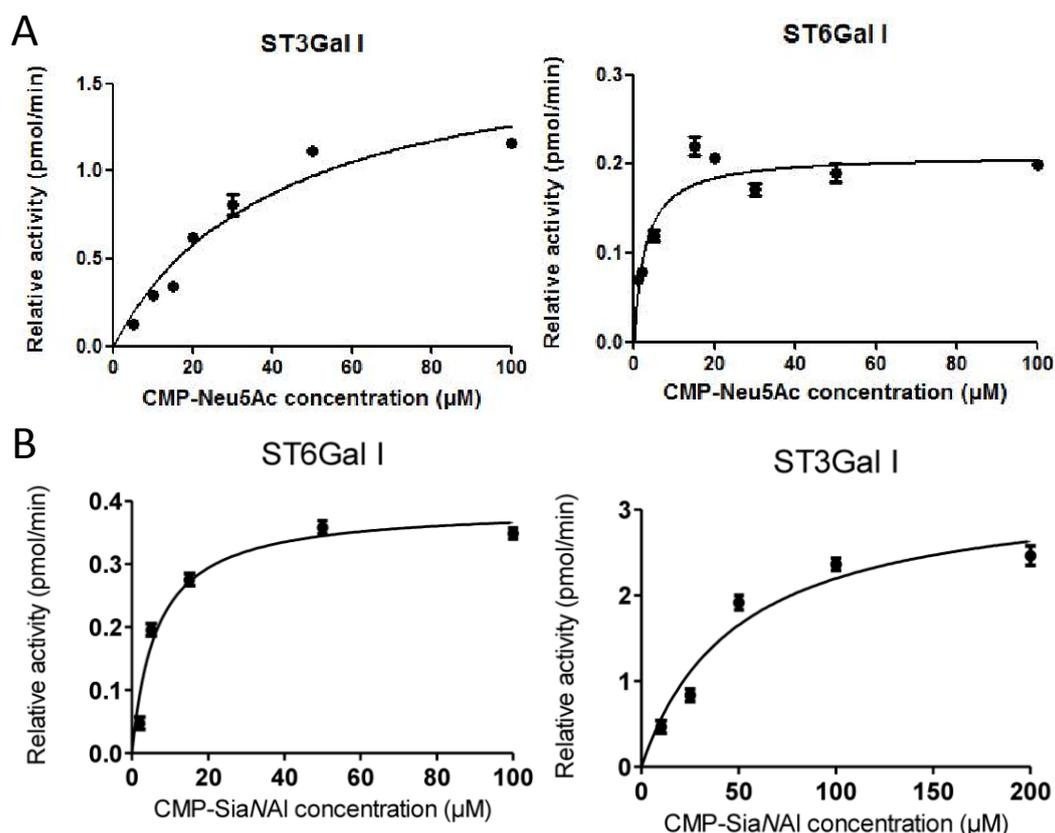


Figure 68. Courbe de Michaelis-Menten de $\Delta 56\text{ST6GAL1}$ et $\Delta 56\text{ST3GAL1}$ vis-à-vis du CMP-Neu5Ac ou du CMP-SiaNAI. A) Courbe de Michaelis-Menten de $\Delta 56\text{ST6GAL1}$ et $\Delta 56\text{ST3GAL1}$ vis-à-vis du CMP-Neu5Ac. Les différentes concentrations indiquées sur l'axe des abscisses ont été obtenues en ajoutant uniquement du CMP-Neu5Ac radioactif pour les basses concentrations et 14.5 μM complétées par du CMP-Neu5Ac froid pour atteindre la concentration désirée. La radioactivité associée au substrat accepteur a ensuite été comptée après une incubation de 6 h. B) Courbe de Michaelis-Menten de $\Delta 56\text{ST6GAL1}$ et $\Delta 56\text{ST3GAL1}$ vis-à-vis du CMP-SiaNAI. La quantité de CMP-SiaNAI associée au substrat accepteur à chaque concentration a été mesurée par LC/MS³ après hydrolyse de la liaison glycosidique entre l'acide sialique et le galactose et une dérivation du SiaNAI par le DMB. Extrait de Noel *et al.* 2017.

Pour confirmer cette observation, nous avons également employé une méthode indirecte grâce à l'apport de la radioactivité. Nous avons incubé conjointement le CMP-[¹⁴C]-Neu5Ac avec soit le CMP-SiaNAI ou le CMP-Neu5Ac fraîchement synthétisés dans l'équipe de Yann Guérardel. La concentration des substrats donneurs a été ajustée pour atteindre la valeur indiquée dans la figure 69. Cette expérience montre que quel que soit le substrat donneur utilisé, le radioisotope est transféré de la même manière montrant qu'il n'y a pas de préférence de substrat pour nos 2 enzymes.

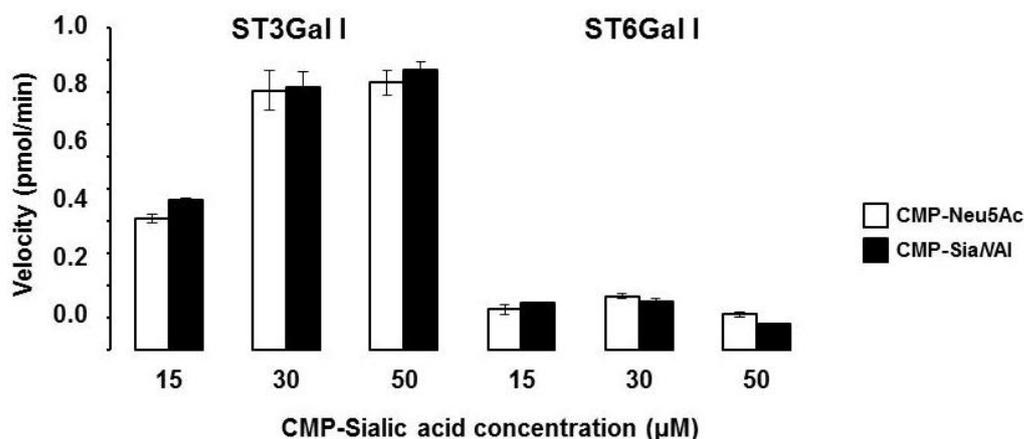


Figure 69. Activité enzymatique des 2 enzymes recombinants envers les 2 substrats donneurs. Dix microlitres de milieu de culture des cellules HEK293 transfectées contenant la ST3GAL1 (panel de gauche) ou la ST6GAL1 (panel de droite) ont été incubés pendant 6 heures avec différentes concentrations finales d'acide sialique (15-50 μ M) dont du CMP-acide sialique et 50 000 DPM de CMP-[14 C]Neu5Ac utilisé comme traceur et 60 μ g d'asialofétuine. Les résultats représentent la moyenne (+/- SE) de 3 expériences indépendantes). Tiré de (Noel et al., 2017).

En conclusion de cette partie, nous avons démontré ici en utilisant des approches *in vitro* que le CMP-SiaNAI et CMP-Neu5Ac étaient utilisés de la même façon par Δ 56ST6GAL1 et Δ 56ST3GAL1 pour la sialylation d'une glycoprotéine, l'asialofétuine. Le CMP-SiaNAI peut être utilisé à des fins de caractérisation biochimique des sialyltransférases et permet de déterminer l'affinité des sialyltransférases vis-à-vis des glycanes accepteurs. Cependant l'utilisation de glycoprotéines *in vitro* réduit le champ d'étude vis-à-vis de différents N-glycanes. C'est pourquoi nous avons voulu étendre ces approches à d'autres accepteurs potentiels des enzymes ST3GAL1 et ST6GAL1 et avons donc utilisé des cellules qui expriment une plus grande variété de glycanes et de glycoconjugués.

2. *In cellulo*

Nous avons déterminé si le CMP-SiaNAI pouvait être utilisé pour caractériser biochimiquement les sialyltransférases vis-à-vis de glycoprotéines à la surface de cellules en culture. Pour cela, nous nous sommes inspirés des travaux de Mbua et collaborateurs qui venaient d'être publiés sur l'utilisation d'une ST6GAL1 de rat pour la sialylation exogène et sélective de cellules modèles, les CHO (Chinese Hamster Ovary cells) (Mbua et al., 2013). Ces cellules sont naturellement déficientes en l'expression de ST6GAL1 (Vishwanathan et al., 2015), de plus la lignée mutante Lec2 possède, contrairement à la lignée originelle K1, la caractéristique d'exprimer un antiporteur

CMP/CMP-NeuAc SLC35A1 déficient, ce qui inhibe fortement l'entrée de CMP-acide sialique au sein de la lumière de l'appareil de Golgi et entraîne la présence de glycoconjugués asialylés au niveau de la membrane plasmique. Ces cellules en culture ont été incubées avec le milieu de culture contenant les sialyltransférases recombinantes $\Delta 56ST6GAL1$ et $\Delta 56ST3GAL1$ et différentes concentrations de CMP-Neu5Ac ou CMP-SiaNAI. Elles ont ensuite été incubées avec des lectines fluorescentes spécifiques des substrats sialylés formés et analysées soit en microscopie confocale pour visualiser ces glycoconjugués, soit en cytométrie en flux pour quantifier cette fluorescence au niveau de la membrane plasmique. En première approche, pour marquer les glycoconjugués membranaires sialylés par ST6GAL1, nous avons utilisé la lectine SNA (*Sambucus Nigra Agglutinin*) et pour ST3GAL1 la lectine MAL-II (*Maackia amurensis*). Cette approche nous a permis de vérifier simplement si la sialylation exogène était possible (Geisler and Jarvis, 2011; Shang and Van Damme, 2014). Une analyse par microscopie confocale, nous a permis de visualiser les substrats membranaires pour ST6GAL1 (figure 70). En revanche, aucun signal n'est apparu avec la MAL-II pour la détection de l'activité de la ST3GAL1 sur les O-glycannes (données non montrées). Cette absence de signal pourrait venir d'un problème d'expression ou d'accessibilité des O-glycannes pour l'enzyme ST3GAL1 ou pour la lectine. Une étude de North *et al.* a démontré que les cellules Lec2 portaient des O-glycannes avec la séquence disaccharidique Gal β 1-3GalNAc uniquement (North et al., 2010).

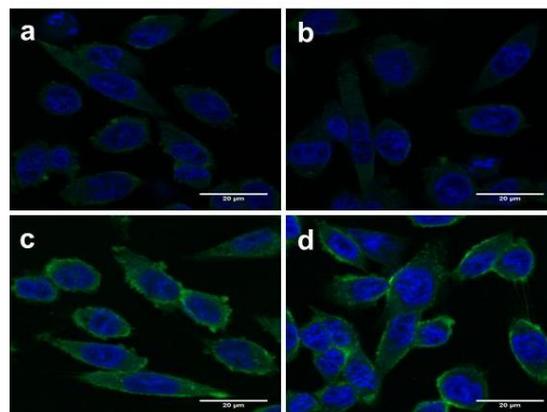


Figure 70. Activité *in cellulo* de ST6GAL1 sur les CHO-Lec2 en microscopie. Microscopie confocale des cellules CHO-Lec2 après sialylation exogène par ST6GAL1. Deux cent microlitres du milieu de culture contenant ST6GAL1 (b, c ou d) ou de milieu mock (a) ont été incubés 2 heures avec les cellules CHO-Lec2 et 20 μ M de CMP-Neu5Ac (c) ou de CMP-SiaNAI (d). Les cellules ont ensuite été fixées avec du paraformaldéhyde 4% et incubées avec la SNA-FITC (1/75^{ème}). Les noyaux sont marqués avec le DAPI (bleu). Issu de (Noel et al., 2017)

Une analyse en cytométrie de flux de cellules CHO-K1 ou -Lec2 resialylées de façon exogène par les enzymes $\Delta 56ST6GAL1$ et $\Delta 56ST3GAL1$ en présence de CMP-SiaNAI, nous a permis de

quantifier l'intensité de fluorescence au niveau de la membrane plasmique de ces cellules vivantes. Dans l'expérience illustrée dans la figure 71A, les cellules CHO ont été sialylées avec différentes concentrations en CMP-Neu5Ac ou CMP-SiaNAI et Δ 56ST6GAL1 durant 2 heures. Elles ont ensuite été marquées à la SNA-FITC et analysées en cytométrie de flux. L'analyse de l'intensité de fluorescence a montré que celle-ci augmente avec la concentration en substrat donneur. Cependant, cette fluorescence est supérieure pour le CMP-SiaNAI comparé au CMP-Neu5Ac sur les mêmes concentrations (Figure 71B). Nous avons précédemment prouvé que l'affinité des sialyltransférases envers les différents substrats donneurs d'acide sialique est la même, et nous en avons donc conclu que l'affinité de la lectine envers le substrat formé était supérieure quand celui-ci est porteur de SiaNAI.

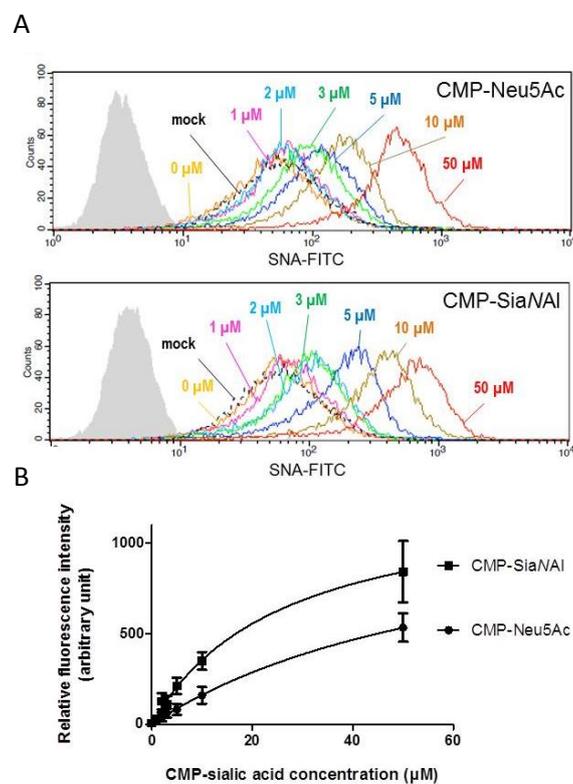


Figure 71. Activité *in cellulo* de ST6GAL1 sur les CHO-Lec2 en cytométrie. A) Analyse de cytométrie en flux après sialylation exogène en utilisant 300 μ L de milieu de culture contenant ST6GAL1 ou de milieu mock et différentes concentrations de CMP-Neu5Ac ou CMP-SiaNAI allant de 0 à 50 μ M. L'incubation a été réalisée pendant 2 heures et les glycoconjugués sialylés ont été détectés par la SNA-FITC (1/100) et analysé en cytométrie. L'autofluorescence est représentée en gris. Ces données représentent 3 expériences indépendantes. B) Représentation graphique de la variation de l'intensité de fluorescence (+/- SD) selon la concentration en CMP-acide sialique. Tiré de (Noel et al., 2017)

L'ensemble des travaux présentés dans ce paragraphe ont fait l'objet d'une publication dans ChemBioChem. En 2017 que je signe en premier auteur.

C. Utilisation du CMP-SiaNAI déjà clické par ST3GAL1 et ST6GAL1

Comme pour la microscopie confocale, aucun signal n'a été obtenu en cytométrie en flux lorsque nous avons voulu resialyler de façon exogène ces cellules CHO avec la $\Delta 56$ ST3GAL1 (figure 72), probablement parce que les *O*-glycannes sont relativement petits par rapport aux *N*-glycannes (North et al., 2010) et donc inaccessibles à l'enzyme ou à la lectine MAL-II.

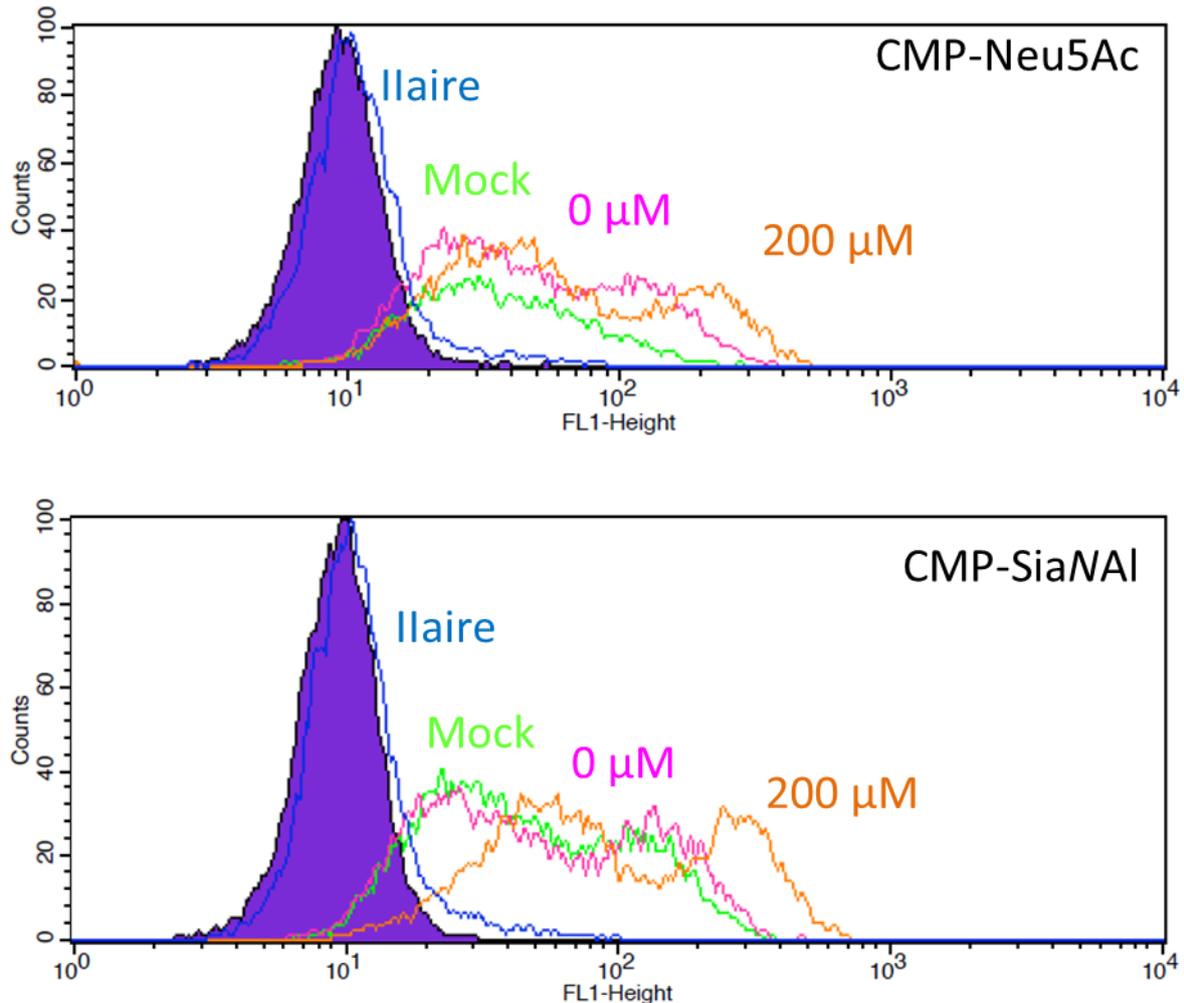


Figure 72. Activité *in vivo* de ST3GAL1 sur les CHO-Lec2. Analyse de cytométrie en flux après sialylation exogène en utilisant 300 μ L de milieu de culture contenant $\Delta 56$ ST3GAL1 ou de milieu mock et 0 ou 200 μ M de CMP-Neu5Ac ou CMP-SiaNAI. L'incubation a été réalisée pendant 2 heures et les glycoconjugués sialylés ont été détectés par la MAL-II-FITC (1/50) et visualisés par la streptavidine-FITC et analysés en cytométrie. L'autofluorescence est représentée en violet.

Pour tenter de pallier ce problème, nous avons utilisé le CMP-SiaNAI directement lié de façon covalente à une molécule de biotine. C'est-à-dire que nous avons réalisé la réaction de chimie click

entre le CMP-SiaNAI et une biotine azoturée (azido-PEG3-biotine) avant même de réaliser la réaction de sialylation exogène avec les $\Delta 56ST6GAL1$ et $\Delta 56ST3GAL1$. En outre, cette stratégie présentait aussi l'avantage de ne pas utiliser de cuivre directement sur les cellules pour réaliser la CuAAC. Nous avons sialylé les cellules CHO-Lec2 avec les $\Delta 56ST6GAL1$ et $\Delta 56ST3GAL1$ en utilisant un nouveau substrat donneur présentant un acide sialique très volumineux (Figure 73).

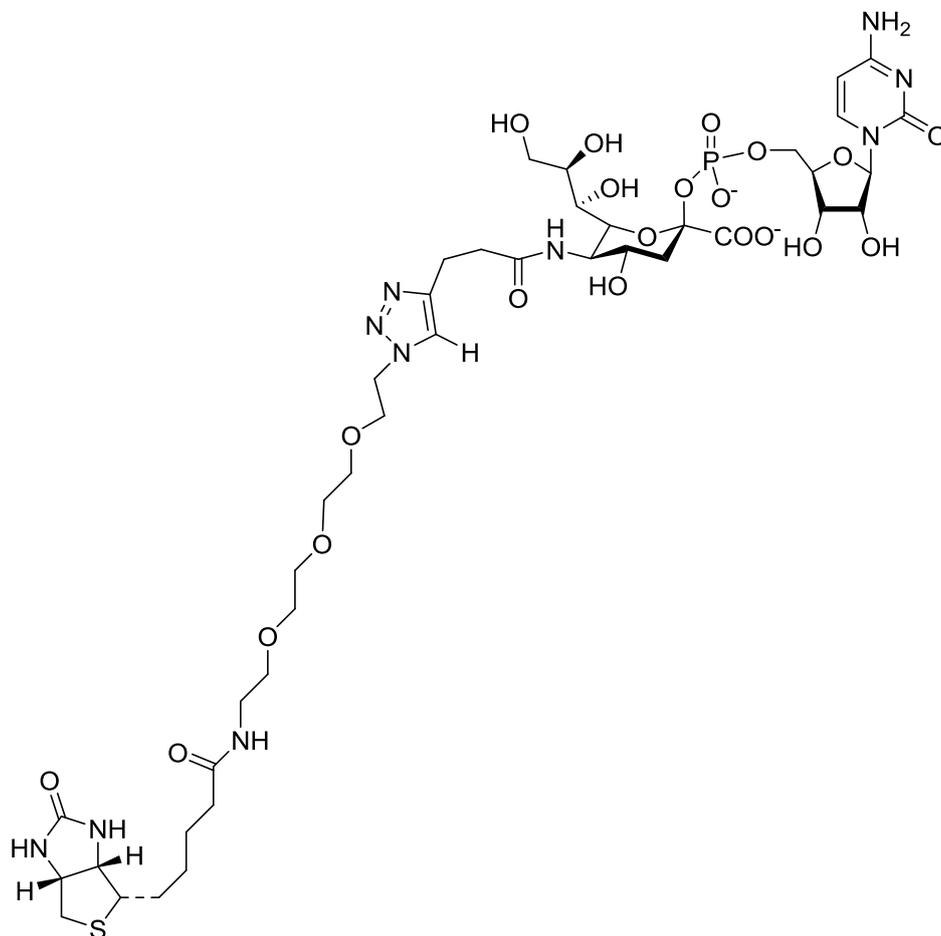


Figure 73. Représentation du CMP-SiaNAI couplé à la molécule d'azido-PEG3-biotine par CuAAC.

Après la réaction de sialylation exogène avec ce composé, nous avons utilisé une streptavidine-FITC qui reconnaît la partie biotine de cette molécule transférée et analysé les cellules CHO ainsi marquées en cytométrie en flux (figure 74). Les résultats de cette expérience montrent que les conditions de sialylation avec le milieu mock, $\Delta 56ST6GAL1$ et $\Delta 56ST3GAL1$ émettent une intensité de fluorescence assez importante suggérant que la molécule est facilement transférée sur les glycoconjugués (Figure 74A). Cependant, la fluorescence est plus importante lorsque les cellules sont incubées avec $\Delta 56ST6GAL1$ ou $\Delta 56ST3GAL1$ confirmant le transfert de ce composé par nos sialyltransférases recombinantes. Cette expérience montre également qu'il est possible de marquer les substrats sialylés par la $\Delta 56ST3GAL1$ avec le CMP-SiaNAI déjà couplé à la biotine, suggère qu'il s'agissait donc bien d'un problème d'accessibilité de la lectine dans l'expérience précédente. Nous

avons également testé ce nouveau substrat donneur sur la lignée des CHO-K1 pour voir s'il était possible de visualiser les substrats non sialylés en α 2,6 dû à l'absence d'expression de ST6GAL1 endogène (Figure 74B). Dans cette expérience, la fluorescence détectée est supérieure uniquement avec ST6GAL1. Cette nouvelle molécule permet donc de visualiser plus spécifiquement et sensiblement les substrats non sialylés portés par la lignée des CHO et il est probable que l'on puisse identifier ces substrats porteurs de ce dérivé d'acide sialique comme la réalisé l'équipe du Dr. Steet (Yu et al., 2016).

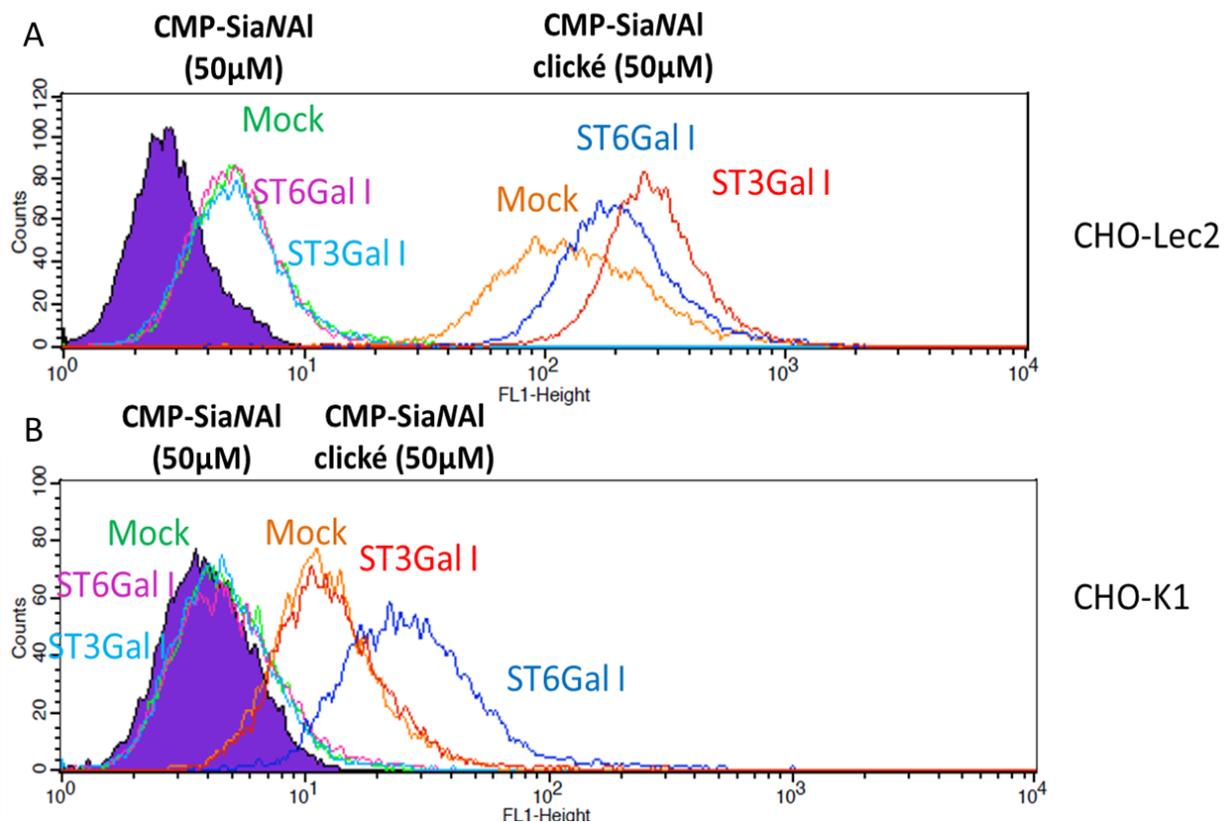


Figure 74. Activité *in vivo* de ST3GAL1 et ST6GAL1 sur les CHO-Lec2 avec le CMP-SiaNAI clické. Analyse de cytométrie en flux après sialylation exogène en utilisant 300 µL de milieu de culture contenant ST3GAL1, ST6GAL1 ou du milieu mock et 0 ou 200 µM de CMP-SiaNAI clické sur des cellules CHO-Lec2 (A) ou CHO-K1 (B). L'incubation a été réalisée pendant 2 heures et les glycoconjugués sialylés ont été visualisés par la streptavidine-FITC (1/500). L'autofluorescence est représentée en violet.

En conclusion, j'ai démontré ici que les Δ 56ST6GAL1 et Δ 56ST3GAL1 recombinantes produites dans un milieu de culture de cellules transfectées, donc sans purification préalable, sont capables d'utiliser des donneurs d'acide sialique non naturels tels que le CMP-SiaNAI avec la même affinité que le CMP-Neu5Ac, le substrat naturel. D'un point de vue mécanistique, cela renforce l'idée que les sialyltransférases reconnaissent la fraction nucléotidique du donneur et transfèrent indifféremment

tous les acides sialiques. En outre, j'ai montré que ces enzymes peuvent être utilisées pour marquer très spécifiquement les *N*- ou *O*-glycannes des glycoprotéines *in vitro* et aussi *in cellulo*. Ces approches offrent donc la possibilité de pouvoir suivre spécifiquement et sélectivement certains glycoconjugués. Par ailleurs, le couplage direct du CMP-SiaNAI avec l'azido-biotine avant la réaction de sialylation exogène de cellules vivantes permet d'éviter les problèmes d'accessibilité par la lectine et d'augmenter la sensibilité du marquage.

IV. Utilisation et développement d'un outil simple permettant d'étudier les caractéristiques biochimiques des sialyltransférases : le MPSA (Microplate Sialyltransferase Assay)

L'étude des sialyltransférases est un enjeu important tant d'un point de vue fondamental que clinique comme en témoignent les demandes de collaborations multiples avec notre équipe pour étudier l'activité des sialyltransférases dans diverses pathologies comme le cancer ou pour la caractérisation d'inhibiteurs. Jusqu'à présent, la méthode de choix pour la caractérisation biochimique des sialyltransférases *in vitro* était l'utilisation de substrats radiomarqués tels que le CMP-[¹⁴C]Neu5Ac. Même si cette approche est très sensible, elle s'avère coûteuse et soumise à de plus en plus de restriction. C'est pourquoi nous avons cherché à développer un outil de détermination de l'activité enzymatique des sialyltransférases sur plaque plus rapide et moins onéreux que nous avons nommé MPSA (MicroPlate Sialyltransferase Assay). Cette technique permet d'étudier l'activité enzymatique des sialyltransférases de façon simple, rapide, sensible et sans danger pour l'utilisateur en exploitant les propriétés du CMP-SiaNAI.

Le principe est d'adsorber dans le fond de puit d'une plaque multipuit une glycoprotéine utilisée en tant que substrat accepteur. Après saturation des puits avec de la BSA oxydée, cette glycoprotéine est incubée avec la sialyltransférase d'intérêt et le CMP-SiaNAI. Ensuite, l'azido-biotine est liée de façon covalente à chaque molécule de SiaNAI transférée puis révélée à l'aide d'un anticorps anti-biotine couplé à la HRP. Enfin l'activité de la HRP est révélée par le TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) et l'absorbance est mesurée à 620 nm (figure 75).

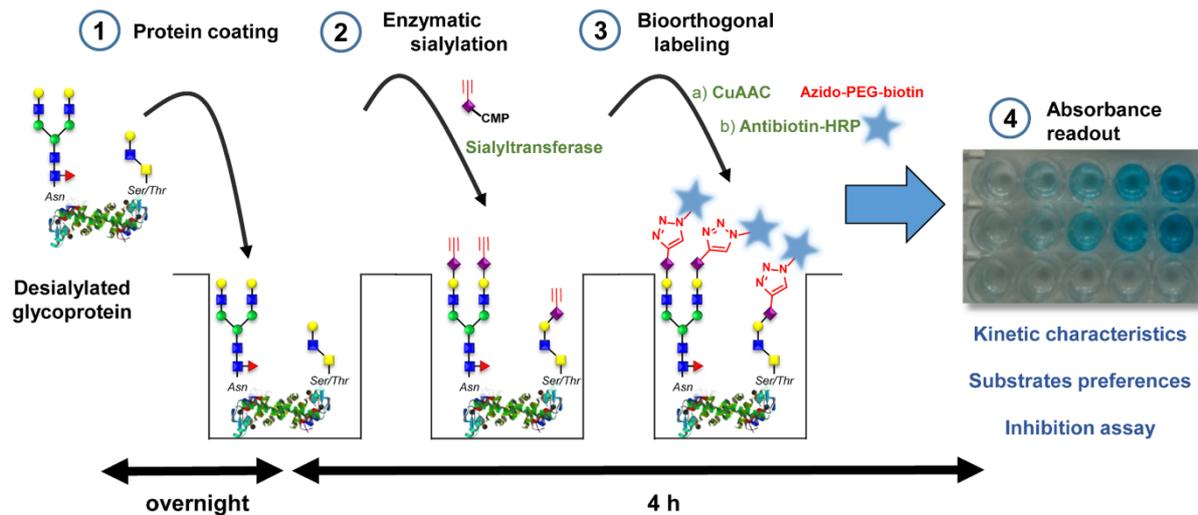


Figure 75. Principe du test MPSA. Une glycoprotéine est adsorbée dans le fond du puits puis sialylée avec la sialyltransférase et le CMP-SiaNAI. Le SiaNAI transféré est ensuite lié à une biotine azidée qui est détectée par un anticorps anti-biotine couplé à la HRP. L'activité de la HRP est révélée par du TMB dont l'absorbance est mesurée par spectrophotométrie à 620 nm. Tiré de (Noel et al., 2018).

A. Preuve de concept du test enzymatique sur plaque avec $\Delta 56ST6GAL1$

Pour avoir la preuve de concept et mettre au point ce test enzymatique, nous avons utilisé la $\Delta 56ST6GAL1$ recombinante produite dans le milieu de culture de cellules HEK293 transfectées car nous avons déjà prouvé qu'elle utilisait le CMP-SiaNAI avec la même affinité que le CMP-Neu5Ac. Après avoir adsorbé l'asialofétuine dans le fond des puits, nous avons fait varier la concentration en CMP-SiaNAI de 0 à 100 μM durant l'incubation avec $\Delta 56ST6GAL1$ ou un milieu mock issu d'une transfection avec un plasmide vide. Ce dernier va nous permettre de soustraire l'activité endogène présente dans le milieu de culture ou un transfert non enzymatique dû à la propriété électrophile du carbone 2 des acides sialiques sous forme ouverte. L'expérience avec le milieu mock met en évidence un transfert non spécifique du SiaNAI mais montre également que le signal émis avec $\Delta 56ST6GAL1$ est bien supérieur et dépendant de la concentration en CMP-SiaNAI utilisée (Figure 76).

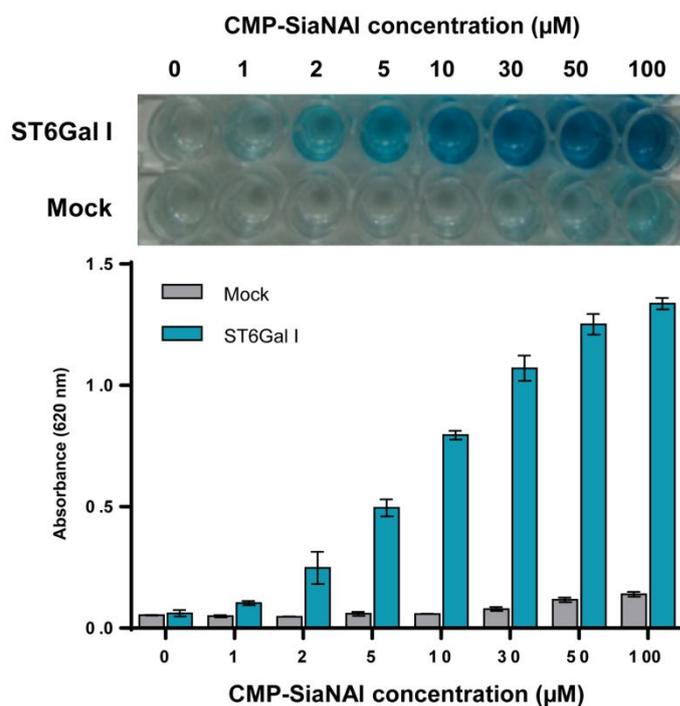


Figure 76. Preuve de concept du MPSA. Expérience de MPSA après incubation avec la protéine recombinante non purifiée $\Delta 56$ ST6GAL1 ou le milieu de culture « mock » et différentes concentrations de CMP-SiaNAI (0-100 μ M). Tous les puits ont été traités avec l'azido-PEG3-biotine par la CuAAC. Le SiaNAI transféré sur l'asialoféтуine par l'enzyme après 1 heure d'incubation et finalement révélé avec un anticorps anti-biotine couplé à la HRP. L'absorbance a été mesurée à 620 nm pour toutes les concentrations de CMP-SiaNAI. Les barres d'erreurs représentent la SEM (n=2). Tiré de (Noel et al., 2018)

B. Optimisation du test enzymatique sur plaque avec $\Delta 56$ ST6GAL1 et $\Delta 56$ ST3GAL1

Pour définir les meilleures conditions d'incubation et obtenir une efficacité optimale, nous avons recherché les quantités d'enzyme minimales requises pour la détection d'un signal. Précédemment, nous avons déjà remarqué que $\Delta 56$ ST6GAL1 était moins produite et sécrétée dans les HEK293. Les essais réalisés avec des quantités variables du milieu de culture contenant la source enzymatique ont montré que le signal n'atteignait pas la saturation. Il n'est donc pas nécessaire de diluer le milieu de culture contenant $\Delta 56$ ST6GAL1. Pour la $\Delta 56$ ST3GAL1, sa quantité étant plus importante, il est nécessaire de diluer le milieu de culture pour rester dans la partie linéaire de la courbe de réaction afin qu'aucun réactif ne soit un facteur limitant (Figure 77A) (Bisswanger, 2014). C'est pourquoi nous avons choisi d'utiliser le milieu de culture contenant la $\Delta 56$ ST3GAL1 diluée au 1/5 dans toutes nos expériences.

L'absorbance finale obtenue est liée à la quantité d'enzyme utilisée et au temps de réaction tant que les substrats ne sont pas des facteurs limitants. C'est pourquoi nous avons ensuite effectué une étude cinétique de l'activité de nos enzymes allant de 0 à 6 h. Pour chacune, l'absorbance maximale est atteinte après 1 h 30 d'incubation, ainsi nous avons fixé la durée de sialylation à 1 h afin de nous assurer de toujours rester dans la phase ascendante de la réaction (Figure 77B).

Pour déterminer des paramètres cinétiques de nos enzymes michaeliennes, il est nécessaire que le substrat accepteur et donneur ne soient pas en quantité limitante. Pour déterminer le K_m de nos enzymes recombinantes vis-à-vis du CMP-SiaNAI, les $\Delta 56ST6GAL1$ et $\Delta 56ST3GAL1$ ont été incubées 1 h avec 400 ng d'asialofétuine et différentes concentrations en substrat donneur (Figure 77C). Une représentation de la courbe de Michaelis-Menten a permis de démontrer les valeurs de K_m de $28.2 \pm 7.8 \mu M$ et $14.8 \pm 2.9 \mu M$ pour ST6GAL1 et ST3GAL1 respectivement. Nous avons donc choisi une concentration de 100 μM pour les prochaines manipulations afin que le CMP-SiaNAI ne soit pas limitant. Ces résultats concordent avec les autres valeurs trouvées dans la littérature (Datta and Paulson, 1995; Vallejo-Ruiz et al., 2001).

Pour la détermination de ces paramètres cinétiques, nous avons déposé plusieurs quantités d'asialofétuine allant de 0 à 400 ng et réalisé la réaction de sialylation avec 100 μM de substrat donneur (Figure 77D). Le plateau est atteint à 400 ng, cette valeur sera donc utilisée à chacune de nos prochaines expériences. Nous avons effectué une détermination graphique de la constante de Michaelis et déterminé un K_m apparent vis-à-vis de l'asialofétuine pour nos 2 sialyltransférases. Celui-ci est de 319.6 ± 151.7 ng ($7.0 \pm 3.3 \mu M$) pour ST6GAL1 et de 88.1 ± 41.1 ng ($1.9 \pm 0.9 \mu M$) pour ST3GAL1, ce qui montre que ST3GAL1 a une meilleure affinité pour l'asialofétuine dans les conditions de l'expérience.

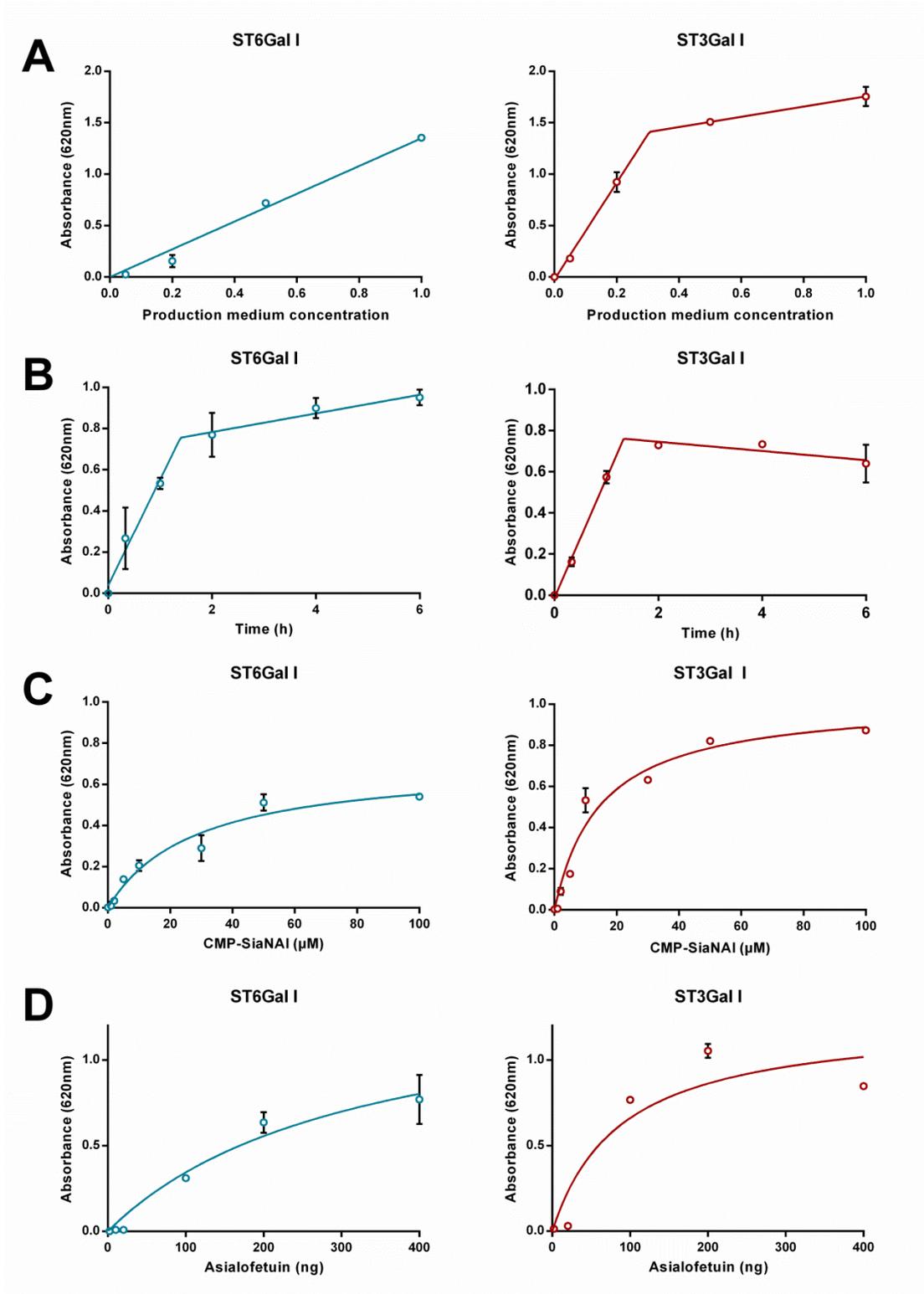


Figure 77. Détermination des paramètres cinétiques avec le MPSA. Sauf si spécifié, 100 μ M de CMP-SiaNAI et 400 ng d'asialofétuine ont été incubés pendant 1 h avec ST6GAL1 ou ST3GAL1. A) Activité en fonction du facteur de dilution de la source enzymatique. B) Absorbance pour ST6GAL1 et ST3GAL1 en fonction de la durée d'incubation. C) Détermination du K_m pour ST6GAL1 et ST3GAL1 envers le CMP-SiaNAI (0-100 μ M). D) Détermination d'un K_m apparent envers l'asialofétuine adsorbé (0-400 ng)/ Les barres d'erreur correspondent à la SEM (n=2). Tiré de (Noel et al., 2018)

Nous avons ensuite voulu déterminer si le test MPSA pouvait être utilisé avec d'autres glycoprotéines. Nous avons ainsi utilisé la sérum albumine bovine (BSA) en tant que contrôle car c'est une protéine non glycosylée, la mucine gastrique porcine (PGM) qui porte des *O*-glycannes principalement avec un noyau de type 1 et 2 (Padra et al., 2018), l'orosomucoïde, aussi connu sous le nom d' α -1-acid glycoprotein, porteuse de 5 *N*-glycannes tri- et tétra- antennés (Imre et al., 2008) et enfin la fétuine qui possède 3 *N*-glycannes et 3 *O*-glycannes sialylés. Les formes sialylées et désialylées par du TFA ont été utilisées dans ce test. Chaque accepteur a été adsorbé dans les puits de plaque 96 puits et incubé 1 h avec soit Δ 56ST6GAL1, Δ 56ST3GAL1 ou le milieu mock et 100 μ M de CMP-SiaNAI (Figure 78). Comme attendu, aucune des formes sialylées n'a été utilisée comme substrat accepteur par nos enzymes, Δ 56ST3GAL1 est plus active sur la PGM car elle est spécifique des *O*-glycannes alors que Δ 56ST6GAL1 est active sur l'asialoorosomucoïde qui ne porte que des *N*-glycannes. Par ailleurs, les 2 sialyltransférases sont capables de sialyler l'asialofétuine. Ces résultats démontrent bien que le test MPSA permet de vérifier la spécificité enzymatique des sialyltransférases en peu de temps.

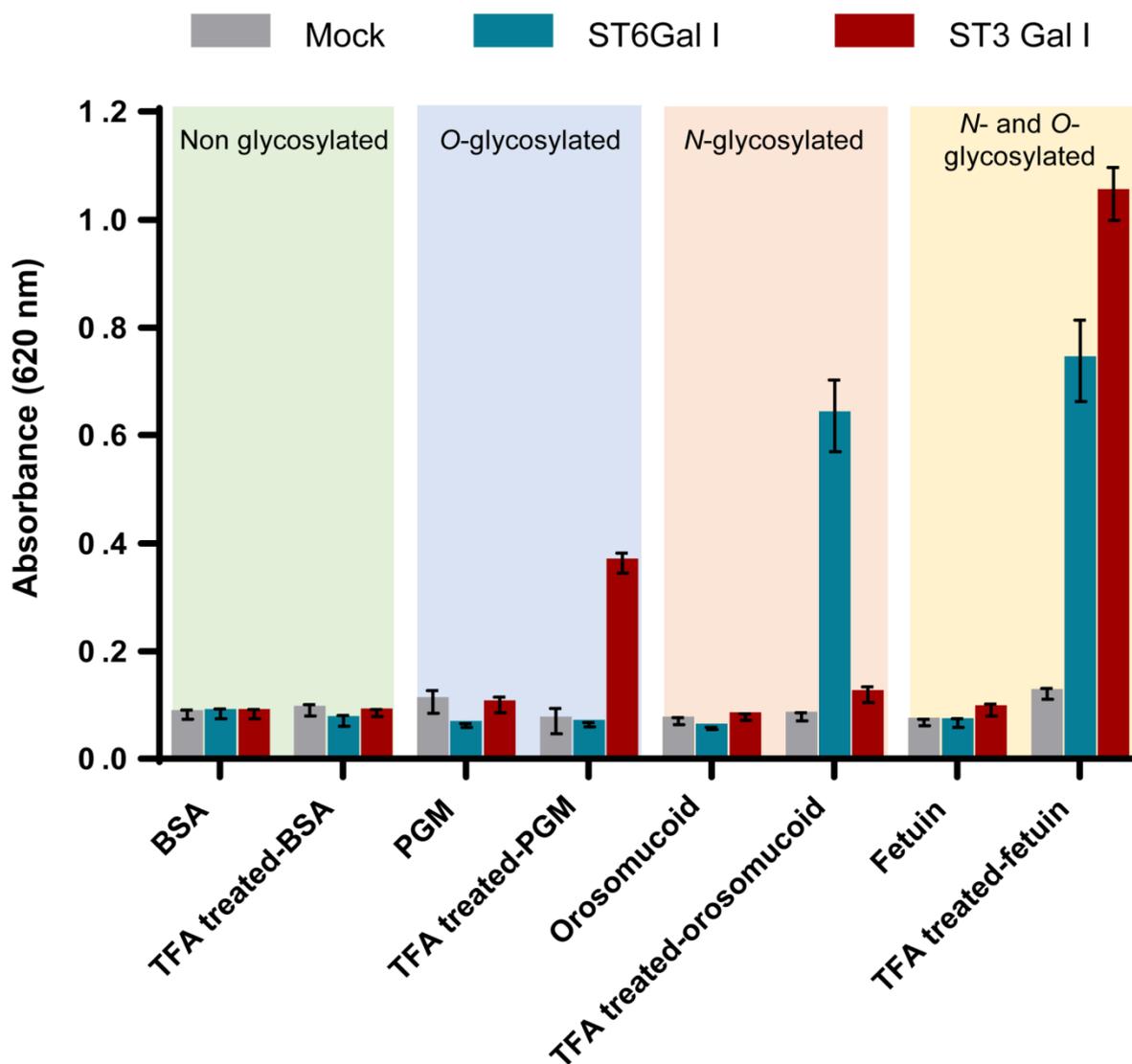


Figure 78. Préférence de glycoprotéines acceptrices pour ST6GAL1 et ST3GAL1. Les milieux Mock, ST6GAL1 et ST3GAL1 ont été incubés avec 100 μ M de CMP-SiaNAI et 500 ng de la glycoprotéine indiquée pendant 1 h. Les barres d'erreurs représentent la SEM, (n=4). Tiré de (Noel et al., 2018)

C. Utilisation du test enzymatique sur plaque MPSA pour déterminer l'effet des cations sur l'activité de Δ 56ST6GAL1 et Δ 56ST3GAL1

Il est aujourd'hui connu que l'environnement a un impact majeur sur l'activité des glycosyltransférases tels que la présence de cations ou des modifications du pH intra-golgien (Dulary et al., 2017; Rivinoja et al., 2009). Nous avons appliqué le test MPSA à l'étude de l'effet de certains cations sur l'activité des sialyltransférases, effet encore peu connu aujourd'hui. Nous avons utilisé 10 mM de magnésium, calcium, cobalt ou zinc pour remplacer les 10 mM de manganèse présent dans le tampon cacodylate utilisé traditionnellement dans les essais de sialyltransférases. Dans cette étude,

nous avons utilisé le CMP comme contrôle positif qui est un inhibiteur des sialyltransférases (Klohs et al., 1979). Il est connu que certaines glycosyltransférases, comme les galactosyltransférases, ont besoin de cations pour être actives. Nous avons donc testé l'effet de 10 mM d'EDTA, un chélateur de cations divalents, sur l'activité de nos sialyltransférases. Comparé au contrôle avec le tampon cacodylate seul, cette expérience a mis en évidence que la présence de 10 mM d'EDTA réduit l'activité des sialyltransférases jusqu'à atteindre 10% de leur activité initiale, indiquant que les cations divalents jouent un rôle dans la réaction de sialylation. Nous avons ensuite étudié l'effet de plusieurs cations sur l'activité enzymatique. Les sialyltransférases recombinantes ont été incubées avec 10 mM de $MgCl_2$, $CaCl_2$, $MnCl_2$, $CoCl_2$ et $ZnCl_2$ (figure 79A). Les résultats montrent que le magnésium, le potassium et le calcium n'ont aucun effet sur $\Delta 56ST6GAL1$ ou $\Delta 56ST3GAL1$. En revanche, le manganèse diminue l'activité de $\Delta 56ST6GAL1$ à $44 \pm 16 \%$ comme cela a été remarqué pour les sialyltransférases circulantes (BAUVOIS et al., 1982; Shah, 1977) mais de façon intéressante, il ne montre aucun effet sur $\Delta 56ST3GAL1$. Le cobalt et le zinc diminuent fortement l'activité de nos enzymes et, à notre connaissance, c'est la première fois qu'un tel effet de ces cations est décrit sur les sialyltransférases. Enfin, nous avons étudié l'effet-dose de ces ions sur l'activité de $\Delta 56ST6GAL1$ et $\Delta 56ST3GAL1$ (Figure 79B). Nous avons trouvé que $\Delta 56ST6GAL1$ est plus sensible à l'inhibition au zinc et au cobalt que la $\Delta 56ST3GAL1$ (Figure 79B).

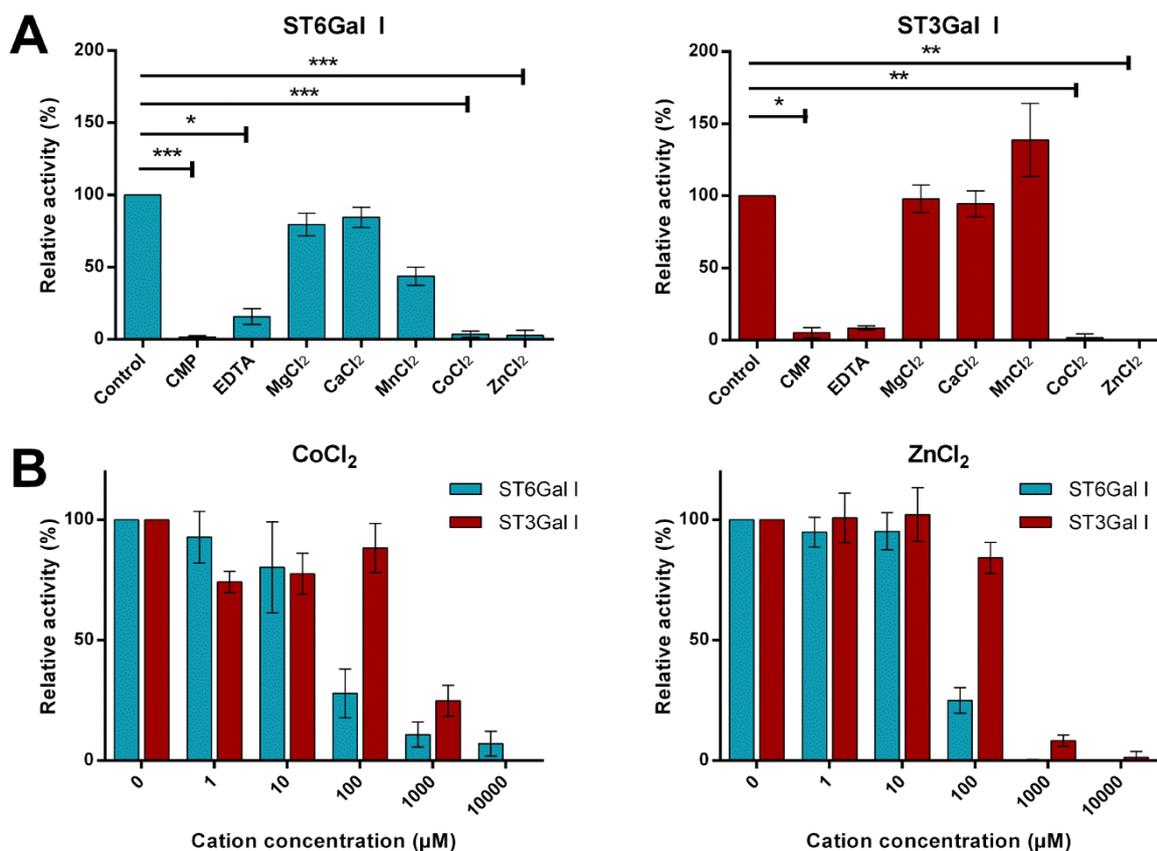


Figure 79. Inhibition sur l'activité de ST6GAL1 et ST3GAL1 recombinantes. A) Activité relative de ST6GAL1 (gauche) et ST3GAL1 (droite) en présence de 10 mM de CMP, EDTA, MgCl₂, CaCl₂, MnCl₂, CoCl₂ et ZnCl₂. Le tampon cacodylate a été utilisé comme contrôle et fixé à 100 %. Les enzymes ont été incubées pendant 1 h avec 100 µM de CMP-SiaNAI et 400 ng d'asialofétuine. Les barres d'erreurs représentent la SEM, (n=3), p-value = 0.0001. B) Effet-dose du CoCl₂ (gauche) et du ZnCl₂ sur l'activité de ST6GAL1 et ST3GAL1. Les enzymes ont été incubées 1 h avec 100 µM de CMP-SiaNAI et 400 ng d'asialofétuine en présence de CoCl₂ ou ZnCl₂ (1 µM – 10 mM). Les barres d'erreur représentent la SEM, (n=6). Tiré de (Noel et al., 2018)

Nous avons poursuivi notre étude en élargissant le nombre de cations utilisés dans le test MPSA afin d'augmenter notre compréhension de l'impact des cations sur la réaction de sialylation. Cependant, ces cations que nous avons testés possèdent des contre-ions différents, c'est pourquoi nous avons testé leur impact sur l'activité enzymatique (Figure 80). Cette expérience montre que le contre-ion n'est pas impliqué dans l'activité enzymatique.

Effet du contre-ion sur l'activité enzymatique

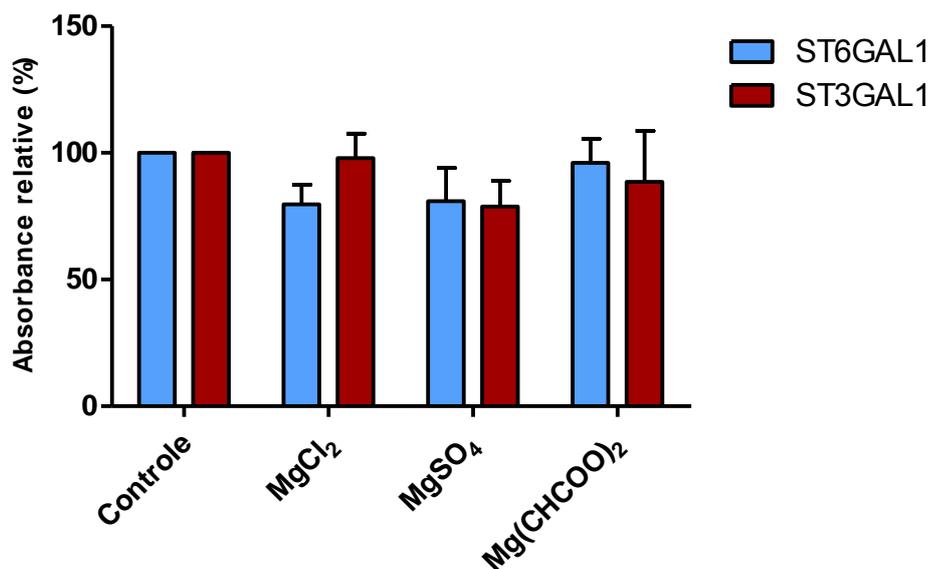


Figure 80. Effet du contre-ion sur l'activité enzymatique. Les milieux de culture contenant ST6GAL1 et ST3GAL1 ont été incubés pendant 1 h à 37°C avec 100 µM de CMP-SiaNAI, 400 ng d'asialofétuine adsorbé et 10 mM de la molécule indiquée. Après chimie-click (CuAAC) pour lier le SiaNAI à la biotine, l'anticorps anti-biotine a été incubé et l'absorbance a été révélée à 620 nm après révélation au TMB.

Ce résultat nous a permis d'élargir la gamme d'ions utilisée pour étudier leur influence sur l'activité enzymatique. Nous avons utilisé le lithium, le sodium, le potassium, le fer, le cuivre, le nickel et le mercure à une concentration de 10 mM (Figure 81). Cette expérience a démontré que, le sodium et le potassium n'ont pas d'effets sur la réaction de sialylation. A l'inverse, le fer, le cuivre, le nickel et le mercure ont une forte capacité d'inhibition de la réaction de sialylation. On peut noter que le lithium inhibe faiblement ST6GAL1 et de façon plus prononcée ST3GAL1.

Effet de différents ions sur l'activité enzymatique

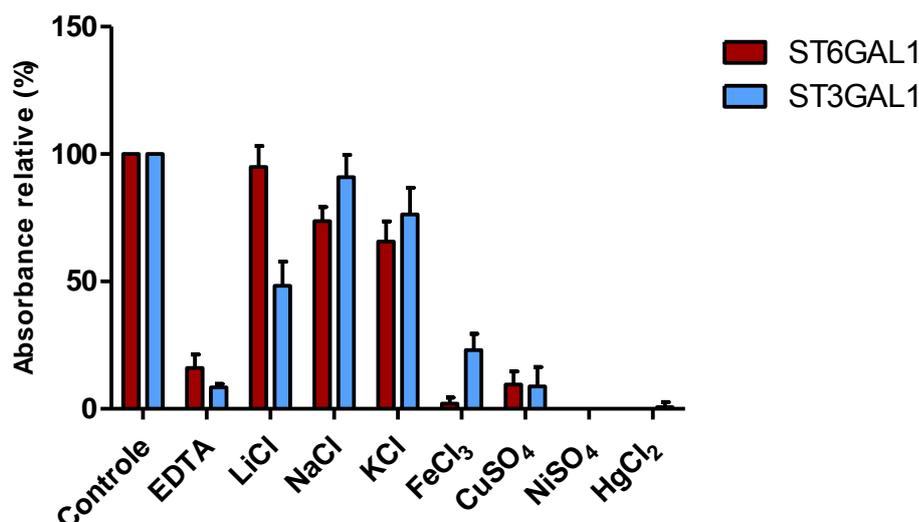


Figure 81. Effets de différents ions sur l'activité enzymatique de ST6GAL1 et ST3GAL1. Les milieux de culture contenant ST6GAL1 et ST3GAL1 ont été incubés pendant 1h à 37°C avec 100 μ M de CMP-SiaNAI, 400 ng d'asialofétuine adsorbée et 10 mM de la molécule indiquée. Après chimie-click (CuAAC) pour lier le SiaNAI à la biotine, l'anticorps anti-biotine a été incubé et l'absorbance a été révélée à 620 nm après révélation au TMB. Pour chaque expérience lepH a été mesuré et n'a été faible que pour le FeCl₃ (pH 2.3) et normal pour les autres (pH \sim 6.0). n=2.

En conclusion, nous avons mis au point et présenté ici un test dédié à l'activité des sialyltransférases qui soit rapide, sensible et facile à utiliser et qui ne requiert aucun équipement spécifique. Avec 2 sialyltransférases différentes (la Δ 56ST6GAL1 et la Δ 56ST3GAL1), nous avons vu que le test MPSA pouvait être utilisé à différentes fins comme la détermination de paramètres cinétiques, la spécificité de substrats accepteurs et la recherche d'inhibiteurs ou encore pour comprendre l'importance des cations dans la réaction de sialylation. Avec le CMP-SiaNAI, nous pouvons appliquer cette technique à d'autres sialyltransférases actives sur les glycoprotéines. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans *Bioconjugate Chemistry* que je signe en premier auteur en septembre 2018.

Par ailleurs, le MPSA nous a même permis de déterminer un K_m vis-à-vis du CMP-SiaNAI déjà clické pour ST6GAL1. Pour cela, nous avons réalisé la chimie-click (CuAAC) entre le CMP-SiaNAI et l'azido-biotine dans des quantités équimolaire puis différentes concentrations de CMP-SiaNAI clické ont été incubées 1 h avec 400 ng d'asialofétuine, l'enzyme ST6GAL1 et un milieu mock pour déterminer le bruit de fond. Après avoir incubé l'anticorps anti-biotine couplé à la HRP, l'absorbance final a été quantifiée et une courbe de Michaelis-Menten a été tracée (Figure 82). Cette expérience a

permis de démontrer que ST6GAL1 possède un Km de $0.92 \pm 0.32 \mu\text{M}$ démontrant une affinité extrêmement forte pour ce substrat.

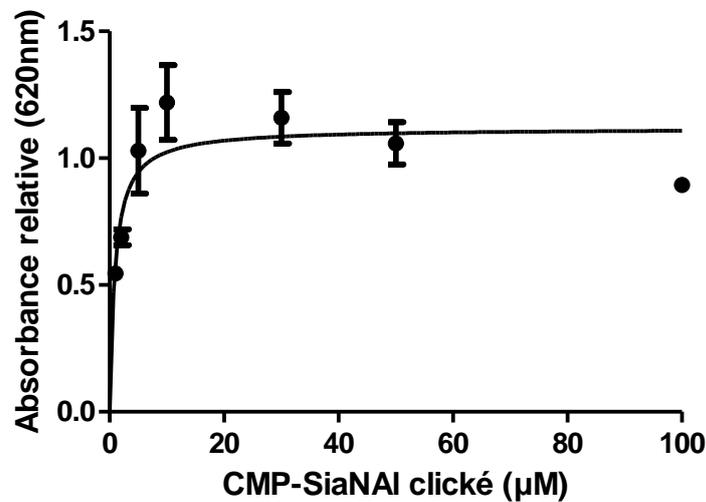


Figure 82. Absorbance relative de ST6GAL1 en fonction de différentes concentrations en CMP-SiaNAI clické (0, 1, 2, 5, 10, 30, 50, 100 µM). $n=2$.

V. Application du test MPSA à la caractérisation enzymatique d'enzymes de poisson-zèbre

Dans l'équipe, nous nous intéressons à l'évolution moléculaire et fonctionnelle des enzymes de sialylation. Les relations évolutives de ces gènes sont établies par des approches de phylogénie moléculaire et de génomique comparative. Il a été montré que ces sous-familles de sialyltransférases connues et décrites chez l'Homme sont le résultat de deux duplications successives qu'a subit l'ancêtre commun aux vertébrés, il y a quelques 500 millions d'années et surtout de la perte massive de ces gènes dupliqués. Certains organismes ont perdu ces gènes dupliqués tandis que d'autres les ont conservés au prix d'un changement de leur fonction. Ces événements géniques sont le point de départ de la divergence fonctionnelle des sialyltransférases. Au cours de mon travail de thèse, j'ai été amené à valider certaines de ces hypothèses évolutives concernant les ST6GAL1 et les ST8SIA6 par des approches de biochimie et l'utilisation du test MPSA.

L'évolution des ST6GAL1 chez les vertébrés est particulièrement intéressante. Des approches de phylogénie moléculaire et de génomique fonctionnelle menées dans l'équipe ont montré une évolution rapide des gènes de *st6gal1* chez les amniotes (reptiles, oiseaux et mammifères). On pense

que les enzymes ST6GAL1 chez les mammifères auraient subi une néo-fonctionnalisation (acquisition d'une nouvelle fonction) au cours du temps, ce qui expliquerait, par ailleurs, la spécificité de certains virus de type *influenzae* sur les cellules épithéliales humaines du tractus respiratoire (Petit et al., 2010). L'analyse des séquences des ST6GAL1 et ST6GAL2 montre une accumulation de substitutions dans les séquences de ST6GAL1 de vertébrés alors que ST6GAL2 est très conservée (Petit et al., 2010). Un alignement multiple des séquences protéiques de ST6GAL1 et ST6GAL2 ou du profil d'expression des gènes *st6gal1* et *st6gal2* dans les différents tissus chez les vertébrés en complément d'une analyse biochimique des enzymes suggèrent que les ST6GAL2 ont conservé leur fonction ancestrale, celle de l'enzyme nommée ST6GAL1/2 dont un orthologue a été décrit chez la mouche *Drosophila melanogaster* (Koles et al., 2004). De fait, des tests enzymatiques ont montré que la ST6GAL2 humaine et la ST6GAL1/2 de *D. melanogaster* ont une meilleure affinité vis-à-vis du LacDiNAc (GalNAc β 1-4GlcNAc) (Koles et al., 2004; Krzewinski-Recchi et al., 2003). L'enzyme ST6GAL1 humaine présente une préférence pour le LacNAc (Gal β 1-4GlcNAc) (Rohfritsch et al., 2006). Pour prouver cette néofonctionnalisation de ST6GAL1 au cours de l'évolution, notre travail a été de caractériser la spécificité enzymatique de la ST6GAL1 de *danio rerio*, une espèce apparue plus tôt que l'Homme au cours de l'évolution et après *D. melanogaster*, et déterminer si celle-ci est plus affine des substrats porteurs de LacNAc ou de LacDiNAc.

Nous avons commencé notre étude en utilisant les formes non tronquées des orthologues de ST6GAL1 en transfectant des cellules CHO-K1. Ces cellules ont été choisies pour l'étude des ST6GAL1 pleine longueur car elles expriment peu de ST6GAL1 endogène (Vishwanathan et al., 2015). Nous avons ensuite réalisé un Western-blot en utilisant un anticorps anti-flag pour visualiser la production dans les cellules (Figure 83).

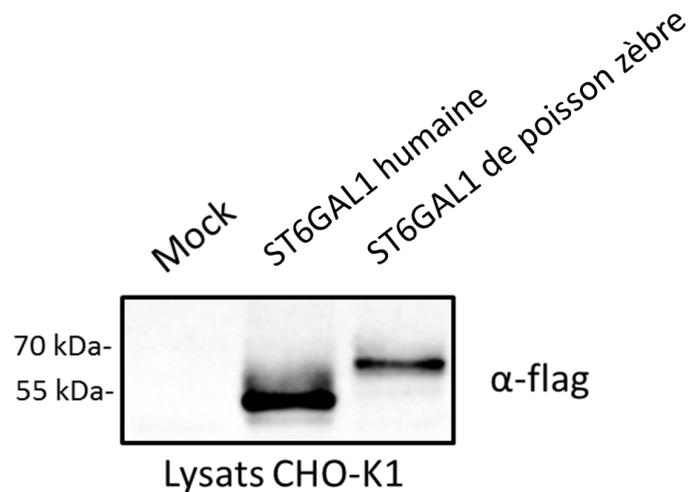


Figure 83. Western Blot des productions de l'orthologue de ST6GAL1 humaine attendu à 49,24 kDa et de poisson-zèbre attendu à 57,18 kDa dans les cellules CHO-K1 en utilisant un anticorps anti-FLAG.

Ces lysats ont ensuite été incubés pendant 6h avec 100 μ M de CMP-[14 C]Neu5Ac et 60 μ g d'asialofétuine, d'asialoorosomucoïde ou du LacDiNAc MP glycoside (TCI chemicals) (Figure 84).

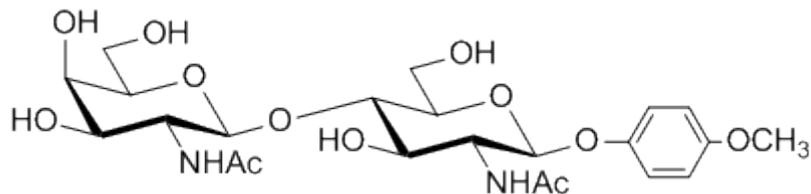


Figure 84. Représentation du LacDiNAc-MP glycoside fabriqué par la société TCI chemicals.

L'activité obtenue avec le lysat mock a été déduite de l'activité obtenue des lysats contenant les ST6GAL1 recombinantes afin de ne mesurer que l'activité de ces enzymes. Cette expérience nous a démontré que la ST6GAL1 humaine est capable de sialyler le LacNAc et le LacDiNAc alors que l'activité est restreinte au LacDiNAc concernant l'enzyme de poisson zèbre (Figure 85).

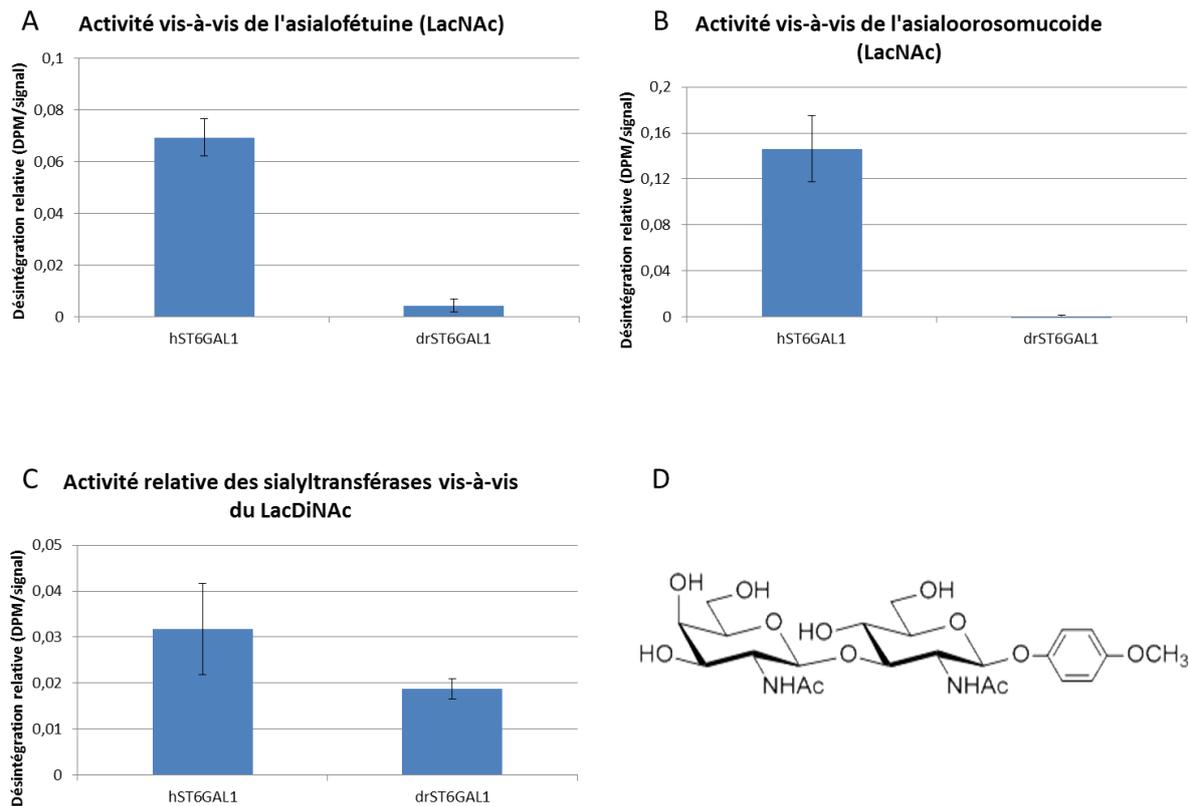


Figure 85. Activité enzymatique de ST6GAL1 d'*Homo sapiens* (hST6Gal I) et *Danio rerio* (drST6Gal I) vis-à-vis de l'asialofétuine (A), de l'asialoorosomucoïde (B) et du disaccharide LacDiNAc (C) représenté en D. n=2.

D'autre part, nous avons utilisé la ST6GAL1 humaine et celle du poisson zèbre sous une forme tronquée. Les formes tronquées sont associées à un tag 3XFlag pour visualiser leur expression et sécrétion. Pour la forme tronquée de ST6GAL1 humaine nous avons utilisé la Δ 56ST6GAL1. En ce qui concerne l'enzyme de poisson-zèbre, nous avons réalisé deux constructions pour la production d'une isoforme délétée du domaine membranaire et sécrétée dans le milieu de culture des cellules transfectées. Une analyse bioinformatique réalisée sur cette séquence *via* le serveur EXPASY DAS-TMfilter (<http://mendel.imp.ac.at/sat/DAS/DAS.html>) indique la présence d'un domaine transmembranaire entre le 19^{ième} et le 35^{ième} acide aminé (Harduin-Lepers, 2013). Cependant, nous avons constaté après transfection dans des cellules HEK293 que cette isoforme tronquée de ST6GAL1 du poisson zèbre était exprimée dans les cellules mais pas sécrétée dans le milieu de culture (Figure 86). On peut expliquer ce problème soit pas une mauvaise prédiction de l'analyse de bioinformatique qui n'a pas permis d'éliminer l'entièreté du domaine transmembranaire et donc la protéine est restée ancrée au niveau de la membrane de l'appareil de Golgi, soit la partie N-ter restante de la protéine a formé des oligomères avec d'autres protéines permettant sa rétention dans l'appareil de Golgi.

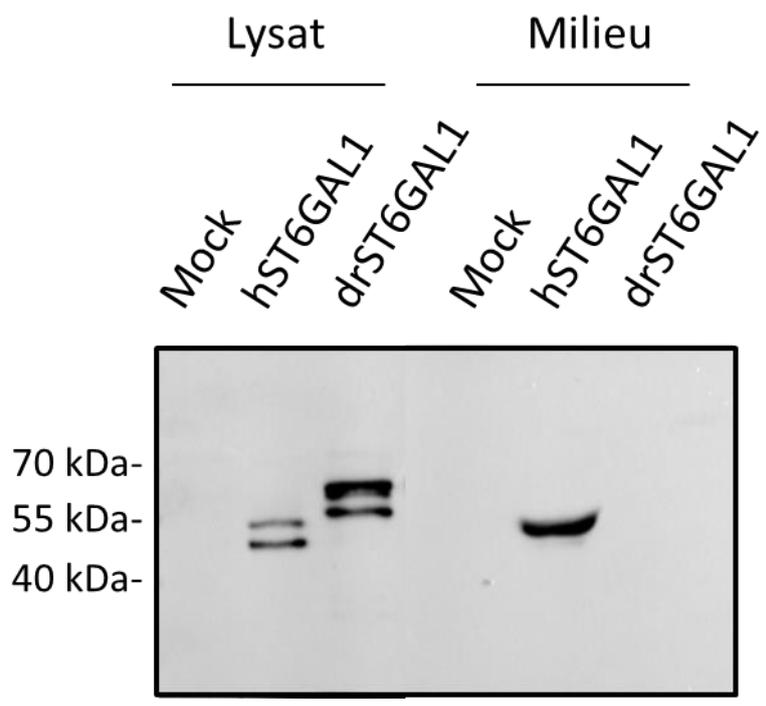


Figure 86. Expression et sécrétion des orthologues de ST6GAL1. Les lysats et milieux de culture provenant de cellules HEK293 transfectées par la $\Delta 56$ ST6GAL1 humaine (hST6GAL1) la $\Delta 33$ ST6GAL1 de poisson zèbre (drST6GAL1) ont été soumis à un Western-blot en utilisant un anticorps anti-FLAG.

Cette expérience a montré qu'une troncature des 33 premiers acides aminés de l'enzyme de poisson zèbre n'était pas suffisante pour que l'enzyme soit sécrétée malgré les prédictions bio-informatiques. Nous avons donc réalisé une seconde construction délétée de ces 135 premiers acides aminés, en amont du domaine catalytique (Figure 87).

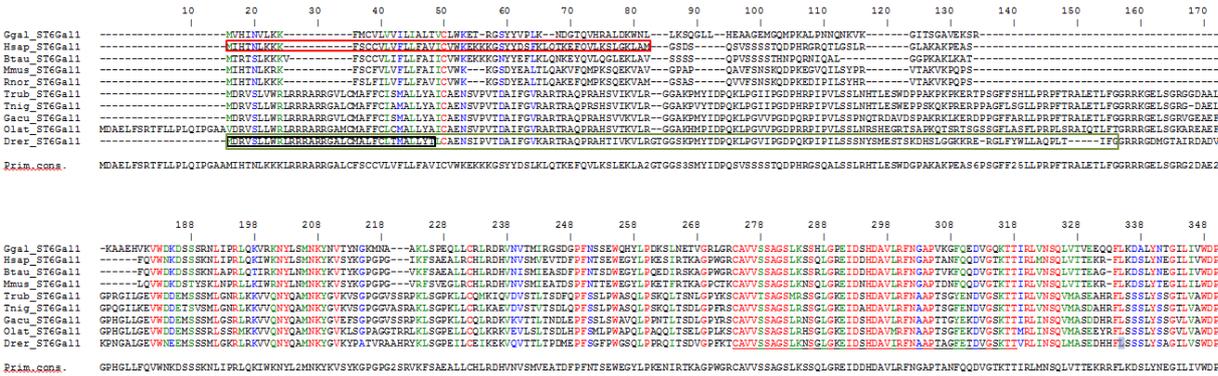


Figure 87. Séquence en acides aminés des différents orthologues de ST6GAL1. Les séquences N-terminal des enzymes ST6GAL1 de *Gallus gallus* (Ggal), *Homo sapiens* (Hsap), *Bos taurus* (Btau), *Mus musculus* (Mmus), *Rattus norvegicus* (Rnor), *Takifugu rubripes* (Trub), *Tetraodon nigroviridis* (Tnig), *Gasterosteus aculeatus* (Gacu), *Oryzias latipes* (Olat), *Danio rerio* (Drer) ont subi un alignement local. Le cadre rouge correspond à la séquence délétée chez la construction $\Delta 56$ ST6GAL1 humaine, le cadre noir à la séquence délétée chez la $\Delta 33$ ST6GAL1 du poisson zèbre et le cadre vert chez la $\Delta 135$ ST6GAL1 chez cette même espèce. Les acides aminés représentés en rouge sont strictement

conservés, ceux en vert sont fortement conservés, ceux en bleu sont faiblement conservés et ceux en noir pas conservés.

Nous avons transfecté des cellules HEK293 avec les plasmides permettant l'expression des formes tronquées et récupérés le milieu de culture 36 h post-transfection. Le niveau d'expression de ces enzymes a été estimé par Western-blot en utilisant un anticorps anti-Flag (Figure 88). Dans la suite de nos essais enzymatiques, ces milieux de culture contenant nos sources enzymatiques d'intérêt ont été dilués afin d'utiliser une quantité équivalente d'enzyme recombinantes. Après quantification du signal avec le logiciel ImageJ, nous avons opté pour une dilution au 1/9 pour la ST6GAL1 de *danio rerio* (Figure 88).

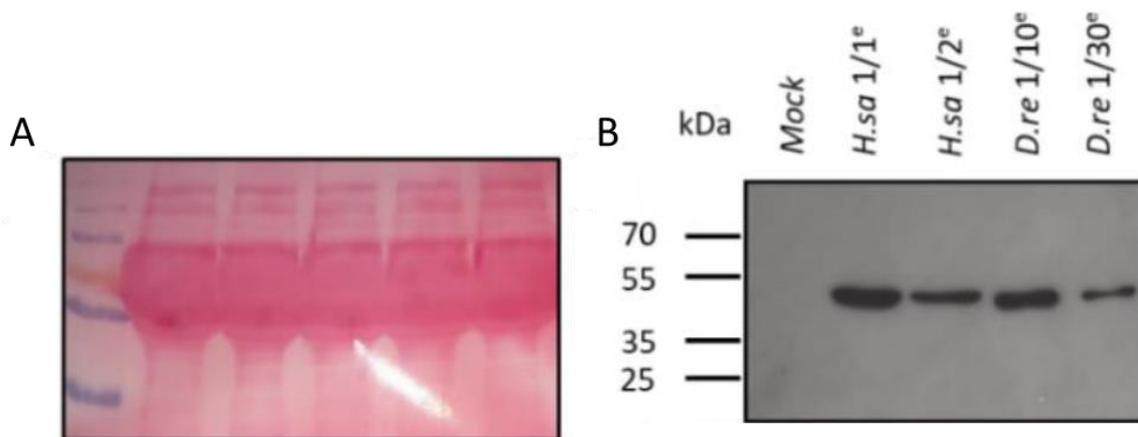


Figure 88. Western-blot dirigé contre les enzymes recombinantes possédant le 3xFLAG. Trente μ L de milieu de culture ont été déposés puis un rouge Ponceau a été réalisé après transfert sur membrane de nitrocellulose (A). La membrane a ensuite été soumise à un Western-blot en utilisant un anticorps anti-FLAG (B).

En première intention, nous avons utilisé le CMP- 14 C]Neu5Ac pour déterminer les meilleures conditions afin d'évaluer l'activité des sialyltransférases recombinantes vis-à-vis de l'asialofétuine et de la fétuine utilisée en tant que contrôle négatif. Les lysats ont été incubés avec 60 μ g de fétuine ou d'asialofétuine et 50 μ M de CMP-Neu5Ac (50 000 DPM de CMP- 14 C]Neu5Ac) pendant 6 h. Ces résultats montrent que la ST6GAL1 humaine est bien active sur l'asialofétuine mais que son orthologue chez le poisson zèbre présente très peu d'affinité vis-à-vis de ce type de substrat (Figure 89). Très peu de transfert est noté sur la fétuine car les positions sialylables sont déjà porteuses d'acide sialique.

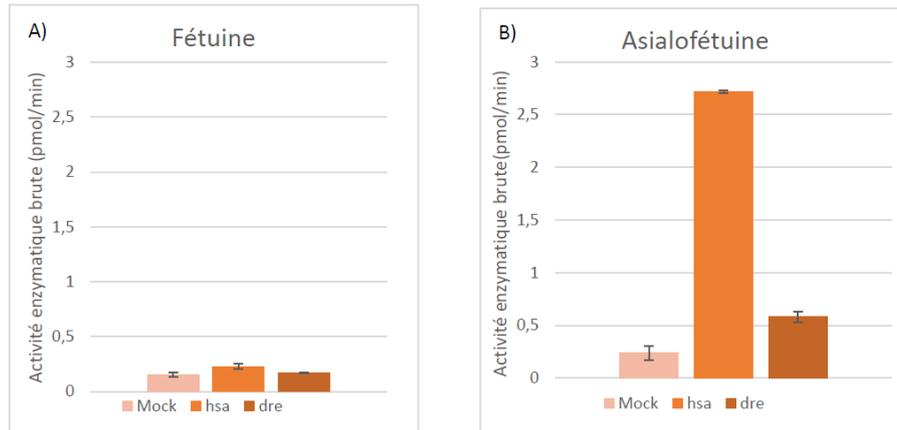


Figure 89. Test de caractérisation enzymatique en utilisant du CMP-[¹⁴C]Neu5Ac. La fétuine (A) et l'asialofétuine (B) ont été incubées avec les orthologues humain (hsa) et de poisson zèbre (dre) de ST6GAL1. Après une incubation de 6 heures à 37°C, les glycoprotéines ont été retenues sur une membrane de fibre de verre et la radioactivité associée a été comptée.

Nous avons alors mis à profit le test sur plaque MPSA pour évaluer s'il pouvait être utilisé pour cette problématique. Nous avons adsorbé 400 ng d'asialofétuine dans le fond des puits et utilisé 100 µM CMP-SiaNAI en tant que substrat donneur (Figure 90). Après une incubation d'une heure, le SiaNAI est lié à la biotine par CuAAC et la biotine détectée grâce à l'utilisation d'un anticorps anti-biotine couplé à la HRP. L'activité de la HRP est révélée grâce au TMB puis l'absorbance est quantifiée à 620 nm. Ce résultat confirme que la ST6GAL1 humaine utilise les glycoprotéines porteuses de LacNAc contrairement à l'enzyme de *danio rerio* qui ne semble pas très active sur ce substrat.

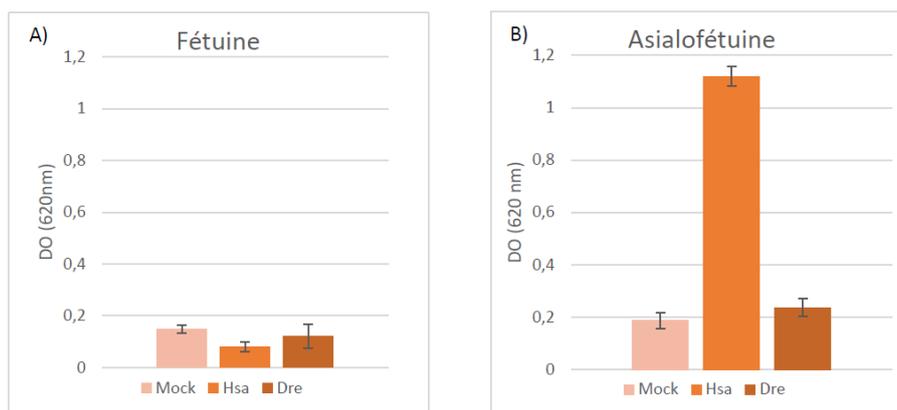


Figure 90. Test de caractérisation enzymatique grâce au MPSA. La fétuine (graphique de gauche) et l'asialofétuine (graphique de droite) ont été incubées avec les orthologues humain (Hsa) et de poisson zèbre (Dre) de ST6GAL1. Après adsorption des glycoprotéines et saturation avec la BSA oxydée, les enzymes ont été incubées dans du tampon cacodylate et 100 µM de CMP-SiaNAI. Après une incubation d'une heure à 37°C, le SiaNAI transféré a été couplé à l'azido biotine par CuAAC. La

biotine ainsi liée est révélée par un anticorps anti-biotine couplée à la HRP dont l'activité a été révélée grâce au TMB. L'absorbance du réactif a ensuite été quantifiée à 620 nm.

Nous avons aussi utilisé une approche de sialylation exogène avec chacune de nos enzymes sur des cellules en culture, comme décrit précédemment. Nous avons utilisé la lignée CHO-K1 qui présente des glycoconjugués exposant des substrats de type LacNAc non sialylés en $\alpha 2,6$, puisque cette enzyme est sous-exprimée (Vishwanathan et al., 2015). Nous avons également obtenu auprès du Dr. Cummings une lignée CHO-Lec8/ B4GALNT. Les cellules CHO-Lec8 présentent une déficience du transporteur d'UDP-Galactose. Ces cellules ont été transfectées stablement avec la $\beta 1,4$ GalNAc-transférase de *C. elegans* (Kawar et al., 2005) et de ce fait, elles expriment du LacDiNAc en lieu et place du LacNAc sur leurs glycoconjugués. Après une sialylation d'une heure avec 100 μ M de CMP-SiaNAI couplé à la biotine et les différentes enzymes, nous avons détecté les substrats transférés avec l'aide d'une streptavidine-FITC et analysé les cellules en cytométrie en flux (figure 91).

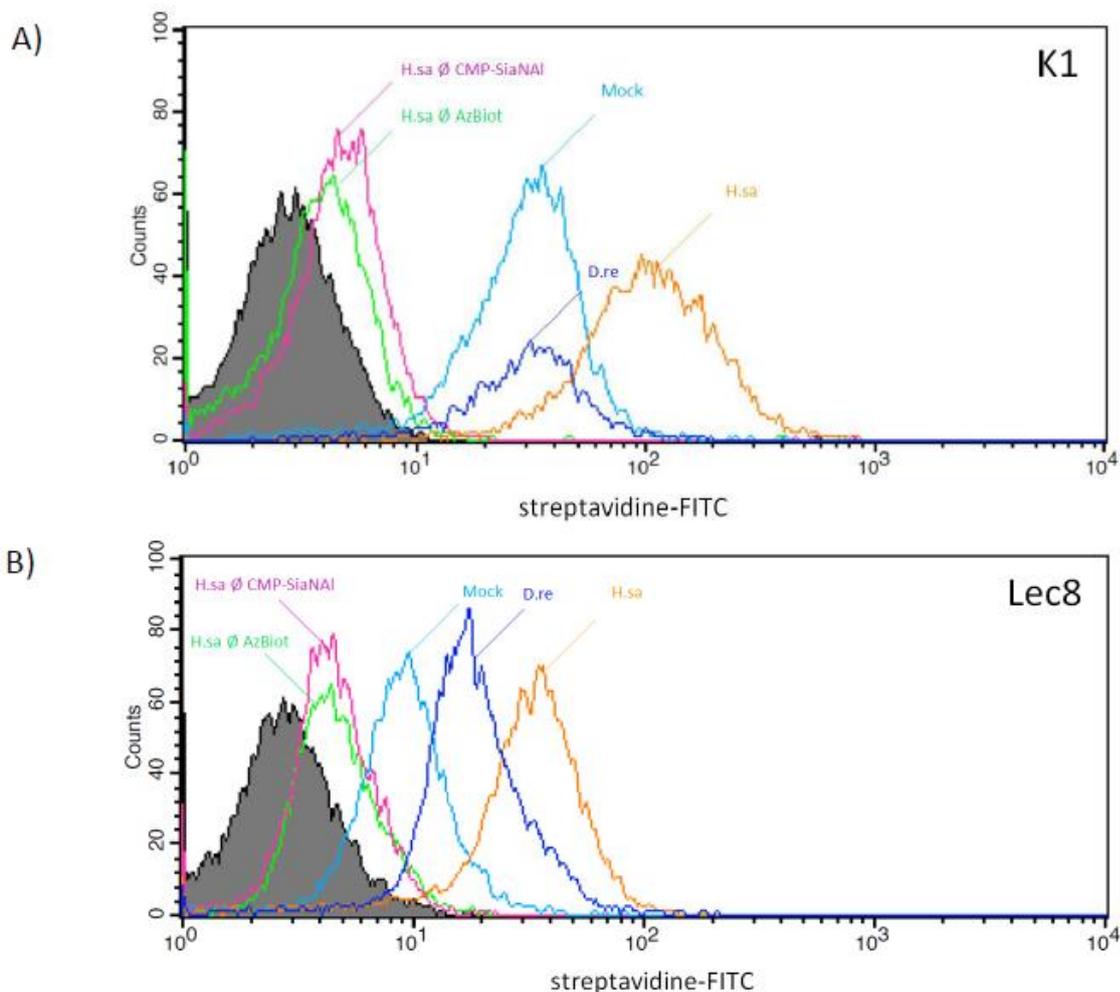


Figure 91. Analyse de cytométrie en flux des lignées CHO-K1 (A) et CHO-Lec8 (B) sialylées de façon exogène avec les orthologues de ST6GAL1. Les cellules ont été sialylées 1 h avec 100 μ M de CMP-

SiaNAI couplé à la biotine et un milieu mock (courbe bleu claire), un milieu contenant la ST6GAL1 de *danio rerio* (courbe bleu foncée) ou l'enzyme humaine (courbe orange). En tant que contrôle, l'enzyme humaine a également été incubée avec l'azido-biotine seule (courbe verte) ou le CMP-SiaNAI seul (courbe rose). L'autofluorescence est représentée par la courbe en aire grise. Expérience représentative de 3 expériences indépendantes.

Cette expérience a montré que la forme humaine de ST6GAL1 reconnaît les glycoconjugués cellulaires porteurs de LacNAc et LacDiNAc de façon similaire. En ce qui concerne l'orthologue de poisson zèbre, l'enzyme n'est active que sur la lignée Lec8 comme l'indique la différence d'intensité avec la condition mock. Il est intéressant de noter que la lignée des CHO-Lec8 est plus sialylée par la forme humaine que par la forme de poisson zèbre. Ce résultat tend à démontrer que l'enzyme humaine a, au cours de son évolution et de sa néofonctionnalisation, conservée son affinité avec le substrat ancestral. Bien sûr, il aurait été intéressant de confirmer cette observation par l'approche MPSA *in vitro* avec des glycoprotéines porteuses de LacDiNAc, mais ce type de substrat n'est pas à notre disposition pour l'instant. Nous avons préparé des extraits cellulaires des cellules des CHO-Lec8/B4GALNT et tenté d'adsorber les protéines sur des plaques multipuits. Cependant, le test MPSA n'a rien donné (données non présentées).

Ces résultats ont été obtenus grâce à un étudiant de master 1 que j'ai encadré pour ce travail.

L'enzyme ST8SIA6 appartient à une autre famille de sialyltransférases catalysant le transfert d'un acide sialique sur un autre résidu d'acide sialique et qui sont nommées ST8Sia. Les gènes de ST8Sia ont évolué très tôt chez les métazoaires par des duplications en tandem et constituent trois groupes de mono-, oligo- ou poly- α 2,8-sialyltransférases avant l'émergence des vertébrés et ces trois groupes ont persisté chez les vertébrés (Harduin-Lepers et al., 2008). Le gène humain *ST8SIA6* appartient au groupe des mono- α 2,8-sialyltransférases, ainsi que *ST8SIA1*, *ST8SIA5* et *ST8SIA7* ce dernier gène ayant disparu chez les mammifères. Chacune de ces sous-familles est issue des deux séries de duplications globale de génome à l'origine des vertébrés (Figure 92).

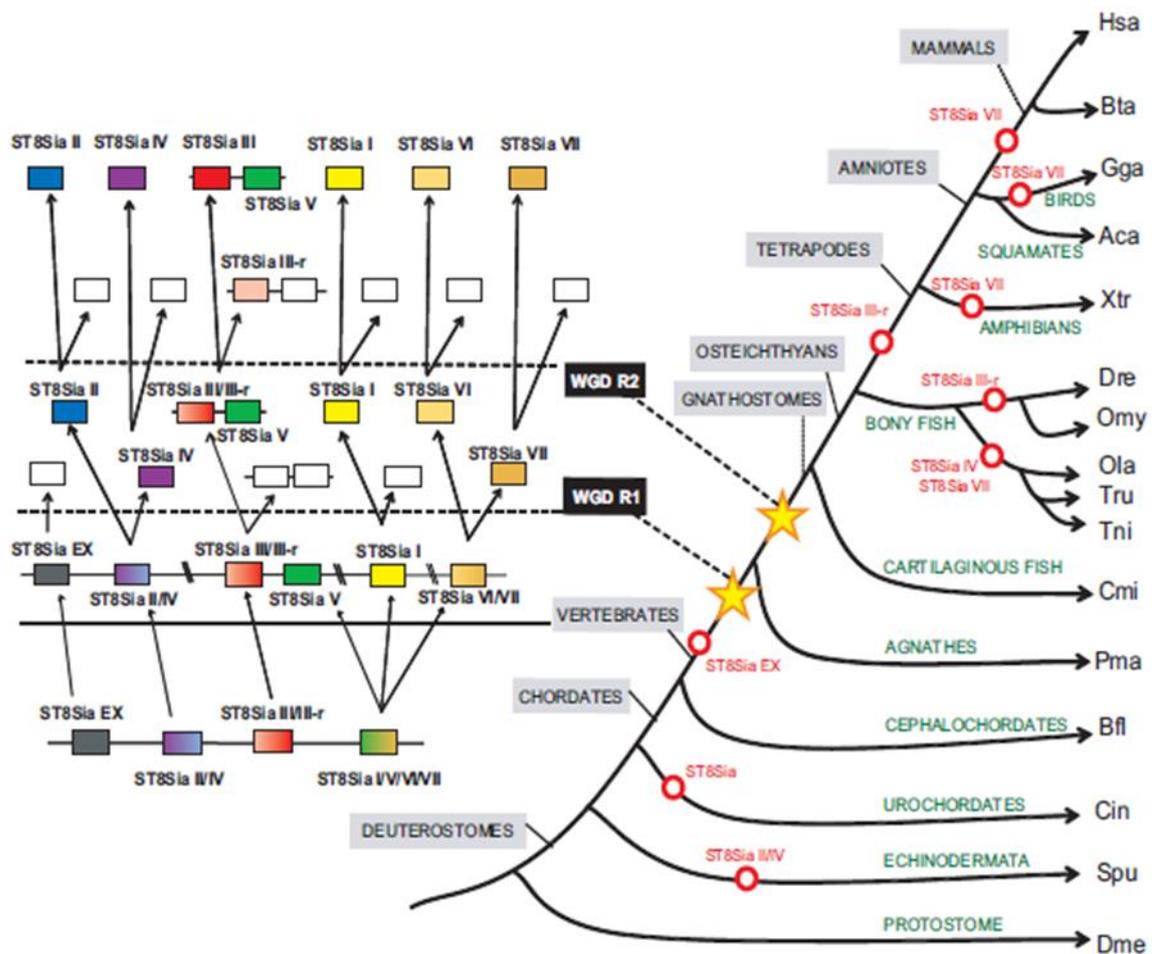


Figure 92. Schématisation de l'évolution des gènes de la famille de ST8SIA. Modèle basé sur la phylogénie des séquences protéiques, la synténie des *loci* entre espèces et la relation entre les paralogues au niveau de la région codante des gènes de ST8SIA. Les cercles rouges correspondent à la perte de gènes dans l'arbre phylogénétique. Les rectangles blancs correspondent à la perte de gènes après l'événement de duplication. Les lignes en pointillés correspondent à la duplication des gènes entiers. D'après (Harduin-Lepers et al., 2008).

L'équipe a montré par des approches classiques de biochimie que cette enzyme catalysait l'addition d'un seul résidu d'acide sialique sur l'antigène sialyl T ($AS\alpha 2,3Gal\beta 1,3GalNAc-O-Ser$) porté par les O-glycosylprotéines. Par ailleurs, des approches structurales, ont montré l'existence de motifs disialylés (disia) sur des O-glycannes dans les embryons de poisson-zèbre (Chang et al., 2009) et plus récemment dans des tissus adultes de poisson-zèbre (Intestin, cerveau cœur) (Yamakawa, Guérardel 2018 en cours de publication). De façon intéressante, dans les embryons de poisson-zèbre on constate la présence de motifs disialylés du type $Neu5Gc\alpha 2,8Neu5Gc$ ou de $Neu5Ac\alpha 2,8Neu5Gc$ mais pas de $Neu5Ac\alpha 2,8Neu5Ac$ ou de $Neu5Ac\alpha 2,8Neu5Ac$ signifiant que le Neu5Ac n'est pas utilisé comme substrat par les enzymes de la famille ST8SIA. L'équipe a cloné la ST8SIA6 de poisson-zèbre. Il

a été trouvé que cette enzyme de poisson est difficile à produire en quantité suffisante et qu'elle est peu active sur la fétuine, mais comme pour l'enzyme humaine, elle fonctionne sur les *O*-glycannes.

L'utilisation du test enzymatique MPSA a permis de compléter ces travaux. Pour confirmer que cette enzyme est bien active sur des substrats porteurs de Neu5Gc, nous avons adsorbé l'asialofétuine dans le fond de puits. Cette dernière a subi une première étape de sialylation avec la ST3GAL1 recombinante et du CMP-Neu5Gc ou du CMP-Neu5Ac afin de confirmer la distinction de substrat que la ST8SIA6 de *danio rerio* peut avoir. Ces substrats sialylés ont ensuite été incubés avec la ST8SIA6 et du CMP-SiaNAI pendant 6 h. Après l'incubation avec cette dernière enzyme et du CMP-SiaNAI, nous avons mesuré l'absorbance après chimie-click avec l'azido-biotine, l'anticorps anti-biotine et l'incubation au TMB (Figure 93).

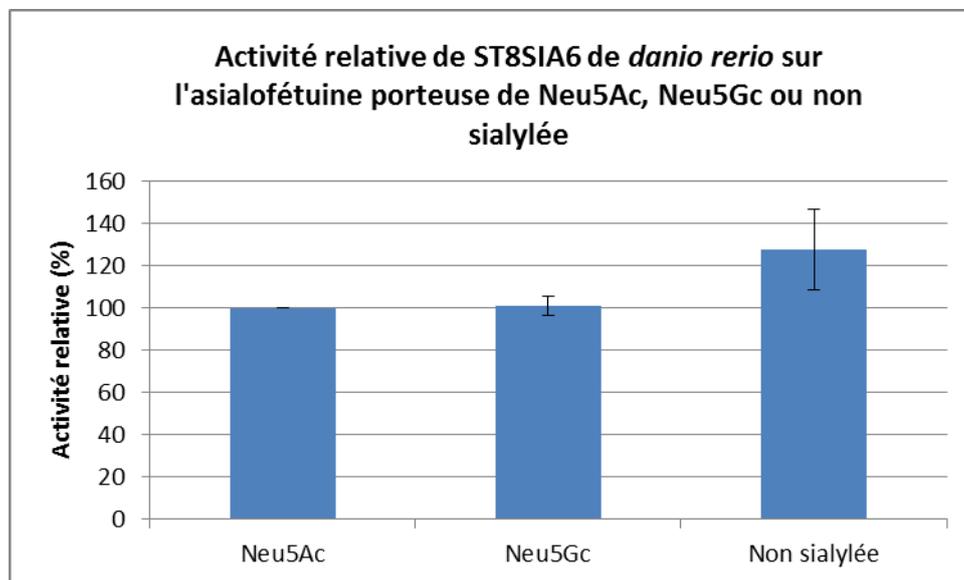


Figure 93. Activité de ST8SIA6 vis-à-vis de substrats porteurs de Neu5Ac ou Neu5Gc. L'asialofétuine a été incubée avec ST3GAL1 et 100 μ M de CMP-Neu5Ac ou CMP-Neu5Gc pendant 1 h à 37°C. Ensuite, la ST8SIA6 a été incubée avec 100 μ M de CMP-SiaNAI pendant 6 h à 37°C. La chimie-click a ensuite été réalisée en utilisant une biotine azoturée et a été suivie d'une incubation avec un anticorps anti-biotine couplé à la HRP. L'activité de la HRP a été révélée par l'utilisation de TMB.

Cette expérience n'a pas montré de différence d'affinité entre le CMP-Neu5Ac et le CMP-Neu5Gc comme attendu. Cependant, l'interaction de ST8SIA avec les contrôles et particulièrement intéressante. ST8SIA6 a une très faible affinité pour la fétuine, contrairement à ce qui a été montré par l'équipe pour l'enzyme humaine et elle semble même capable de sialyler l'asialofétuine (Figure 93). Ces résultats sont étranges car aucune ST8SIA6 de vertébrés n'a encore été démontré comme possédant une activité de sialylation sur un substrat désialylé.

Discussion

I. Développement d'outils pour l'étude des sialyltransférases

Nous avons utilisé et développé des outils afin d'étudier la spécificité des sialyltransférases *in vitro* et *in cellulo*. Ces outils sont basés sur l'utilisation du CMP-SiaNAI et sur l'exploitation de sa capacité à être lié de façon covalente à une sonde.

Nous avons utilisé ST6GAL1 et ST3GAL1 car ce sont les 2 enzymes les plus étudiées et parmi les plus actives. La spécificité de reconnaissance de ces enzymes est aussi bien connue. ST6GAL1 catalyse l'addition d'un résidu d'acide sialique sur un disaccharide de type 2 (Gal β 1-4GlcNAc) porté par des *N*-glycannes et ST3GAL1 sur un disaccharide de type 3 (Gal β 1-3GalNAc). Nous avons exprimé ces enzymes dans le milieu de culture de cellules HEK293 transfectées transitoirement en délétant la queue cytoplasmique et le domaine transmembranaire de ces enzymes.

L'immunoprécipitation de nos enzymes a été réalisée afin de les séparer du milieu de culture. Celui-ci contient du phosphate et rend inenvisageable l'utilisation du milieu brut pour le « sialyltransférase activity kit » commercialisé par R&D. Cette approche a plusieurs inconvénients. Tout d'abord il faut que le CMP-acide sialique utilisé ne soit pas hydrolysé car la présence initiale de CMP augmenterait le signal non spécifique. Ensuite il faut que le milieu réactionnel ne contienne aucune trace de phosphate car celui réagira avec le vert de malachite. Cependant dans les conditions que nous avons utilisé, les enzymes ne sont pas purifiées et le milieu de culture contient énormément de phosphate rendant impossible l'utilisation de ce kit. Les tests réalisés ont mis en évidence que la concentration initiale d'enzyme dans le milieu de culture devait être importante car beaucoup d'enzymes étaient perdues au cours des différentes étapes, notamment durant le nettoyage du milieu de culture par des billes de sépharose « vierge ». C'est pourquoi ST3GAL1 s'est révélée être une bonne candidate dans les tests d'immunoprécipitation alors que ST6GAL1 immunoprécipitée n'a donné aucun résultat probant. Cette approche est donc restreinte aux enzymes fortement sécrétées.

Une analyse bio-informatique sur le serveur : <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/> (ExpAsy database) révèle que le domaine transmembranaire de la ST6GAL1 humaine se trouve entre le 12ème et le 26ème acide aminé. Pour ST3GAL1, il se trouve entre le 12ème et 34ème acide aminé. Pour produire une ST3GAL1 tronquée et active dans le milieu de culture, nous avons suivi les conclusions de l'étude de Vallejo-Ruiz qui démontre qu'une troncature des 56 premiers acides aminés entraîne un rapport activité enzymatique/ sécrétion optimale (Vallejo-Ruiz et al., 2001). Pour ST6GAL1 nous avons procédé à différentes troncatures et estimé que la construction délétée de ces 56 premiers acides aminés est une construction offrant un ratio activité/ sécrétion satisfaisant, de plus cette construction a l'avantage de ne pas être clivée par la protéase BACE1. BACE1 est une

protéase impliquée dans le développement de la maladie d'Alzheimer car elle clive le précurseur protéique de l'amyloïde créant le peptide de β -amyloïde responsable de la formation des plaques caractéristiques de cette maladie. Dans les années 2000, Kitazume et al. ont remarqué que cette protéine clive également ST6GAL1 entre le 40^{ème} et le 41^{ème} acide aminé pour former une protéine soluble (Kitazume et al., 2001). De ce fait, l'utilisation de la construction $\Delta 73$ serait également envisageable mais elle est susceptible d'avoir une reconnaissance plus large au niveau des substrats accepteurs que la forme pleine longueur, comme l'a démontré l'étude de Legaigneur (Legaigneur et al., 2001). Cependant, une étude récente a nuancé les effets de BACE1 sur le clivage de ST6GAL1. Dans cette étude, les auteurs montrent que des cellules fibroblastiques déficientes en l'expression de BACE1 sécrètent ST6GAL1 dans le milieu de culture, cette protéase n'est donc probablement pas la seule impliquée dans le clivage (el-battari et al., 2018). Parmi les délétions que nous avons réalisées, seule la $\Delta 107$ ne présentait aucune activité enzymatique. Il a été démontré que les résidus entre le 93^{ème} et le 100^{ème} acide aminé étaient essentiels dans l'activité de ST6GAL1 démontrant l'importance de la séquence QVWxKDS conservée au cours de l'évolution animale dans l'activité enzymatique et permettant au domaine catalytique d'acquérir une bonne conformation (Figure 94) (Donadio et al., 2003)

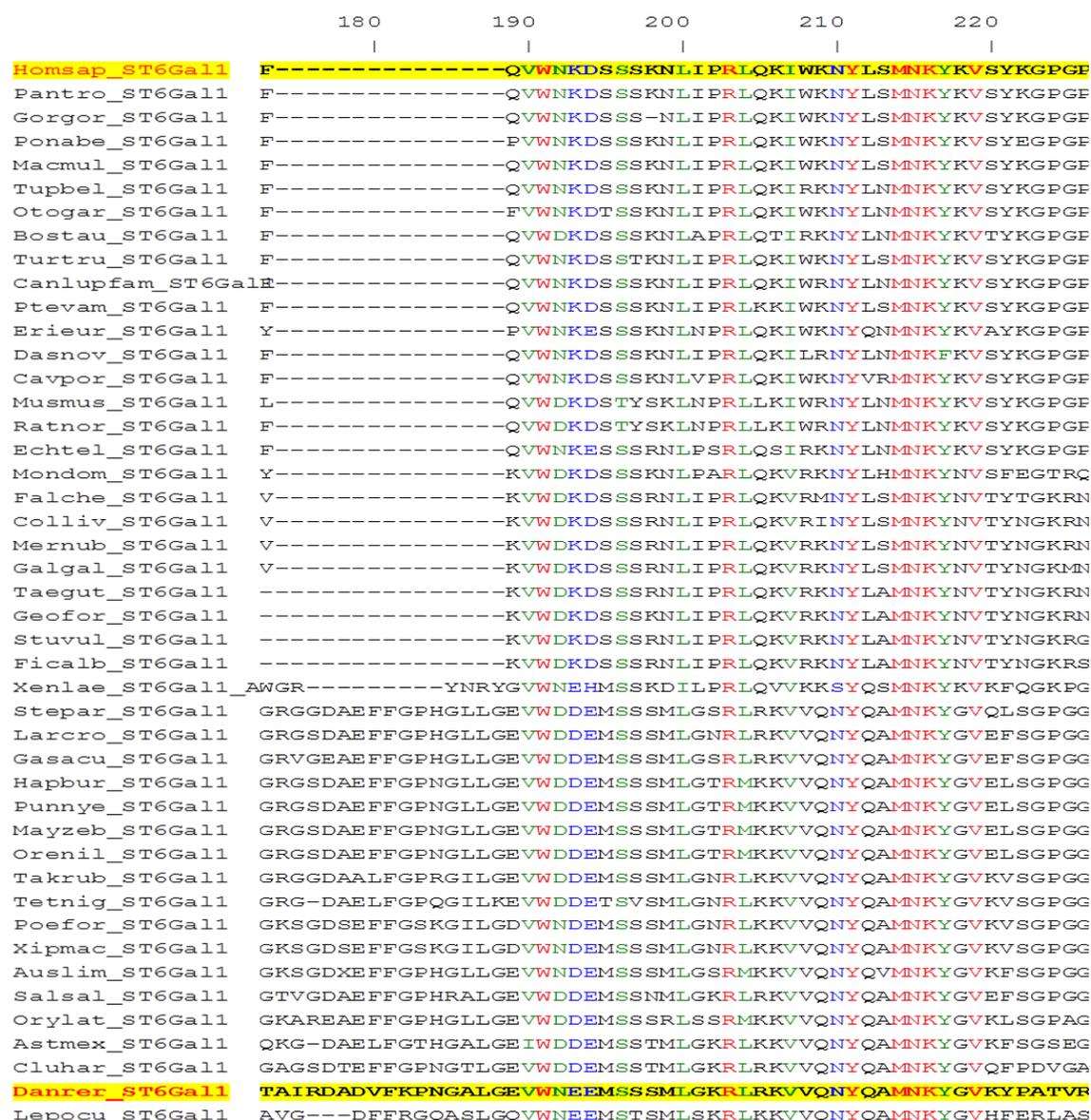


Figure 94. Alignement de séquences protéiques de plusieurs sialyltransférases appartenant à la sous-famille des ST6GAL1. Les séquences surlignées en jaune correspondent à celles utilisées dans l'étude (*Homo sapiens* et *Danio rerio*). La séquence conservée QVWxKDS débute à la 189^{ème} position.

Ces études préliminaires sont nécessaires car supprimer le domaine transmembranaire *via* une analyse bio-informatique ne suffit pas à elle seule à une bonne production d'enzyme. En effet, L'équipe de Kelley W. Moremen a réalisé une détermination bio-informatique des domaines transmembranaires des sialyltransférases faisant partie de la famille GT29 mais également des ppGalNAcT des GT27 et les Gal/ GlcNAcT GT31. Une fois la position de ce domaine déterminée pour chacune des enzymes, ils ont remplacé le domaine transmembranaire et la queue cytoplasmique par un tag permettant de repérer l'enzyme sécrétée dans le milieu de culture. Cependant, ils ont

remarqué que certaines constructions sont produites dans la cellule mais très faiblement retrouvées dans le milieu de culture des cellules transfectées (Moremen et al., 2018).

Après avoir vérifié que nos enzymes recombinantes étaient bien actives grâce à l'utilisation de CMP-^[14C]Neu5Ac, nous avons comparé leur affinité avec le CMP-SiaNAI un substrat donneur non naturel synthétisé au sein de l'unité, par l'équipe du Dr. Yann Guérardel. Par des approches de spectrométrie de masse et en utilisant le CMP-Neu5Ac radioactif comme traceur, nous avons pu établir des Km de ST6GAL1 et ST3GAL1 vis-à-vis de ces 2 substrats (Tableau 6).

Tableau 6. Affinité des sialyltransférases vis-à-vis du CMP-Neu5Ac, du CMP-SiaNAI et du CMP-SiaNAI clické.

Km (μM)	CMP-Neu5Ac	CMP-SiaNAI	CMP-SiaNAI clické
ST6GAL1	2.79 ± 0.53	6.55 ± 1.07	0.92 ± 0.32
ST3GAL1	41.23 ± 7.64	49.03 ± 9.91	x

Les valeurs de Km obtenus correspondent aux valeurs retrouvées dans la littérature qui sont de 18 μM pour ST6GAL1 délétés de ses 28 premiers ou de ses 80 premiers acides aminés et de 14 μM pour ST3GAL1 délétés de ces 56 premiers acides aminés (Legaigneur et al., 2001; Vallejo-Ruiz et al., 2001). Ces résultats démontrent que nos 2 sialyltransférases recombinantes utilisent avec la même affinité le substrat non naturel que le substrat donneur. C'est pourquoi nous l'avons utilisé dans nos expériences de sialylation pour remplacer le CMP-^[14C]Neu5Ac qui est beaucoup plus contraignant à utiliser de par l'utilisation de matériels dédiés et la nécessité d'autorisation difficile à obtenir. Cependant, l'affinité est très différente lorsque l'on utilise le CMP-SiaNAI clické à l'azido-PEG3-biotine. Le Km déterminé est de 0.92 μM ce qui est très faible. La présence du PEG3-biotine augmente cette affinité et il serait intéressant de réaliser une analyse bio-informatique sur la structure connue de ST6GAL1 pour étudier les interactions des acides aminés avec cette molécule et connaître de façon précise comment cette affinité peut être augmentée.

Nous avons ensuite utilisé le CMP-SiaNAI pour des analyses *in cellulo*. Cependant, il est probable que la présence du SiaNAI sur les glycoprotéines à la membrane plasmique influence les interactions avec l'environnement. La sialylation exogène des cellules CHO entraîne une meilleure reconnaissance des cellules porteuses de SiaNAI par la lectine SNA. Cette différence d'affinité pour une lectine a déjà été montrée dans la littérature vis-à-vis d'autres analogues d'acides sialiques modifiés sur le carbone 5 (Erikson et al., 2015). Dans cette étude, les cellules porteuses d'acides sialiques modifiés au niveau de la chaîne N-acyle du carbone 5 interagissent moins avec la SIGLEC-1 portée par les macrophages murins, inhibant ainsi la trans-infection du virus MLV (Murine Leukemia Virus).

Le CMP-SiaNAI clické a également été utilisé dans les approches sur cellule. Les premières expériences réalisées avec le CMP-SiaNAI et ST3GAL1 sur les CHO-Lec2 n'ont pas montré de résultats satisfaisants. Cette observation a mené à 2 hypothèses. La première est basée sur l'étude de glycomique des cellules CHO où l'on apprend que les CHO possèdent de petits *O*-glycannes (Gal β 1-3GalNAc) (North et al., 2010). Ces *O*-glycannes peuvent être inaccessibles pour la sialyltransférase ou la lectine MAL-II qui peuvent être gênées par la présence de *N*-glycane plus imposant et peut être en quantité plus importante. La seconde hypothèse est liée au paragraphe précédent sur l'affinité des lectines avec des substrats non naturels, cette seconde hypothèse suggère simplement que la MAL-II ne reconnaît pas les substrats porteurs de SiaNAI. C'est pourquoi le CMP-SiaNAI clické a été utilisé comme substrat donneur durant la sialylation exogène des cellules CHO avec ST3GAL1 car l'étape de révélation permet de n'utiliser que de la streptavidine-FITC. Cette approche a permis de mettre en évidence un signal supérieur pour ST3GAL1 que pour la condition mock et nous permet de dire que ST3GAL1 a au moins accès au substrat. L'absence de signal avec le CMP-SiaNAI non clické peut provenir d'un problème d'accessibilité de la lectine ou une non reconnaissance.

II. Développement d'un test innovant : le MPSA

Les différents outils mis à disposition des chercheurs pour étudier l'activité des sialyltransférases ont chacun leurs avantages et leurs inconvénients. L'utilisation de la radioactivité est très spécifique car le signal détecté ne peut être émis que par l'acide sialique radiomarqué présent au niveau de la glycoprotéine. Cependant son utilisation est restreinte car il est dangereux pour la santé et également cher. Un autre outil a été développé par Wu et al. afin de rendre l'étude des sialyltransférases simples et accessibles (Wu et al., 2011). Ce kit est basé sur la détection du phosphate du CMP relâché après sialylation. Après action d'une phosphatase qui clive la liaison entre la cytidine et le phosphate, ce dernier est dosé par une réaction au vert de malachite. Cependant, cet outil présente des défauts majeurs car il est nécessaire que les conditions dans lesquelles se déroule l'expérience soient faibles en quantité de phosphate, idéalement sans, car ce phosphate va réagir avec le vert de malachite et créer un bruit de fond qu'il sera difficile de soustraire au signal issu de l'activité enzymatique. Le deuxième inconvénient est qu'il faut utiliser un acide sialique encore lié à la molécule de CMP, auquel cas celui-ci va être pris en charge par la phosphatase et créer lui aussi un bruit de fond. Toutefois, aucun de ces outils ne permet d'étudier l'activité des sialyltransférases de façon peu coûteuse, spécifique et sensible et qui permette d'utiliser des enzymes recombinantes sans passer par des étapes de purification. C'est pourquoi nous avons développé notre propre outil rassemblant tous ces avantages.

Cet outil est basé sur l'utilisation du CMP-SiaNAI synthétisé par l'équipe du Dr. Yann Guérardel et utilisé de la même manière par ST6GAL1 et ST3GAL1 que le CMP-Neu5Ac. La réaction bioorthogonale permise par le groupement alcyne du SiaNAI permet d'obtenir une grande spécificité. En effet, la CuAAC ne peut se faire qu'entre une biotine azoturée et le groupement alcyne de l'acide sialique ce qui nous permet également de pouvoir utiliser nos enzymes recombinantes non purifiées. Par ailleurs, la sensibilité est également très grande car 400 ng d'asialofétuine suffisent pour obtenir un signal avec ST6GAL1 et ST3GAL1. De plus, il est nécessaire de diluer ST3GAL1 au 1/5 pour ne pas obtenir un signal saturé, indiquant qu'une faible quantité d'enzyme suffit. Il est également très rapide car l'absorbance final est obtenu après 4 h de manipulation. Les derniers avantages sont qu'il est peu cher et accessible à une grande communauté de chercheurs. Tous ces arguments font que nous l'avons utilisé pour différentes questions fondamentales basées sur l'étude de la relation structure-fonction des sialyltransférases.

III. Implication des cations dans l'activité enzymatique

Nous avons ensuite voulu démontrer que le MPSA pouvait être utilisé à des fins de screening d'inhibiteurs. Nous avons souhaité associer cette application à l'étude de cations sur l'activité des sialyltransférases. Jusqu'à présent, il n'a jamais été démontré que les cations soient des co-facteurs des sialyltransférases et les cristallographies réalisées jusqu'à présent n'ont jamais détectées de cation au sein de leur structure (Kuhn et al., 2013; Moremen et al., 2018). Cependant, certaines études ont démontré que certains cations pouvaient inhiber l'activité des sialyltransférases et que l'EDTA avait un effet activateur sur leur activité (BAUVOIS et al., 1982; Shah, 1977).

Dans cette étude nous nous sommes principalement intéressés au magnésium, manganèse, calcium, cobalt et zinc car tous ces cations possèdent le même contre-ion (Cl_2). Le CMP, utilisé comme contrôle, inhibe l'activité des sialyltransférases. Il est intéressant de noter que l'EDTA également. Cette condition tend à démontrer que les cations ont un rôle positif sur l'activité des sialyltransférases contrairement à ce qu'annonçait Shah et al. (Shah, 1977) car une fois ces cations chélatés par l'EDTA, ST6GAL1 et ST3GAL1 sont beaucoup moins actives. Cependant, le mécanisme mis en jeu est encore à élucider. Une autre hypothèse serait que les cations jouent un rôle important dans la stabilisation de la liaison entre l'acide sialique et le CMP (Kolter and Sandhoff, 1997). Sans les cations, la liaison serait rompue et les sialyltransférases ne pourraient pas utiliser l'acide sialique, cette hypothèse pourrait être vérifiée par RMN du phosphore de la même façon que pour la synthèse du CMP-SiaNAI.

Le cobalt et le zinc sont les 2 seuls cations capables d'inhiber drastiquement les sialyltransférases et ce de façon similaire. De plus, après avoir confirmé que le contre-ion n'avait pas d'effet sur l'activité des sialyltransférases, le fer, le cuivre, le nickel et le mercure se sont également révélés être des inhibiteurs forts. Nous avons vérifié le pH de chacune de ces solutions et hormis pour le fer qui avait un pH de 2.3, tous les autres cations avaient un pH aux alentours de 6.0, ce qui est le pH désiré pour les réactions de sialylation (Lammers and Jamieson, 1986). L'effet du fer peut donc être dû au faible pH car un pH inférieur à 6 et supérieur à 7.5 inhibe drastiquement l'activité des sialyltransférases (BAUVOIS et al., 1982). De cette expérience, il est intéressant de noter que tous les inhibiteurs forts des sialyltransférases se trouvent dans la partie la plus à droite du tableau périodique de Mendeleïev, parmi les métaux de transition (Figure 95). Il est connu que certains métaux comme le cuivre sous un degré d'oxydation 2 (Cu^{2+}) sont capables de former des complexes organo-métalliques, c'est-à-dire que l'élément crée des liaisons avec des atomes de carbone (Beck, 2009). Il se pourrait que ces métaux s'associent à certains acides aminés et crée un blocage stérique pour l'enzyme, l'empêchant d'être active. Le lithium et le manganèse ont des effets contradictoires, le lithium semble inhiber l'activité de ST6GAL1 mais pas de ST3GAL1, cependant l'expérience est à réitérer pour confirmer cet effet par des approches statistiques. Quant au manganèse il est capable d'inhiber ST6GAL1 mais d'augmenter légèrement l'activité de ST3GAL1. En regardant les valeurs de plus près on se rend compte que cet effet est dû à un duplicat nettement supérieurs aux 2 autres, ce qui démontre que ces points élevés sont issus d'une même expérience et dont la probance peut être débattue (Tableau 7).

Tableau 7. Valeurs de l'activité de ST6GAL1 et ST3GAL1 avec 10 mM de manganèse. Chaque couleur indique les résultats d'une même expérience, chaque condition ayant été réalisée en duplicate. Le contrôle correspond au résultat obtenu sans manganèse pour chaque enzyme et établi à une valeur de 100%.

Contrôle	ST6GAL1	ST3GAL1
100	52,16473	76,55367
100	44,89164	138,7409
100	31,7817	104,2056
100	49,38525	95,68452
100	64,02685	243,8554
100	20,32967	173,8983

Pour tenter d'apporter des éléments de compréhension à ce phénomène d'inhibition, on peut s'appuyer sur la composition des atomes. Tous les atomes dont l'effet inhibiteur est avéré sont

ceux qui se trouvent le plus à droite dans la classification de Mendeleïev, parmi les métaux de transition et il semble que plus l'élément se trouve à droite et plus son inhibition est forte (Figure 94) comme c'est le cas pour le manganèse et le nickel. La différence entre ces 2 atomes est leur quantité de protons qui sont de 25 pour le manganèse et 28 pour le nickel respectivement. Cette différence a un impact sur le nombre d'électron orbitant autour du noyau mais la différence majeure, celle qui impacte les propriétés chimiques, est le nombre d'électrons sur la couche la plus externe, la couche de valence. Or le manganèse, le fer, le cobalt, le nickel, le cuivre et le zinc ont la même couche de valence mais un nombre différent d'électrons sur celle-ci. Malheureusement, ces éléments faisant partie de la famille des métaux de transition, le nombre exact d'électron sur la couche de valence est variable car les électrons des couches plus internes peuvent également se comporter comme des électrons de valence. Ainsi le nombre d'électrons pour l'atome de manganèse est compris entre 2 et 7 alors pour les autres métaux de transition il est compris entre 1 à 3 (http://dl.clackamas.edu/ch104-06/valence_electrons.htm). En résumé, il est difficile d'expliquer le mécanisme exact mettant en jeu le cobalt, le nickel, le cuivre, le zinc et le mercure dans l'inhibition des sialyltransférases de par le déplacement des électrons au sein des différentes couches électroniques.

TABLEAU PÉRIODIQUE DES ÉLÉMENTS

Le tableau périodique des éléments est présenté avec les périodes (1 à 6) et les groupes (I A à VIII A). Les éléments suivants sont encadrés :

- Encadré bleu :** H, Li, Be, Na, Mg.
- Encadré vert :** Mn.
- Encadré rouge :** Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Hg.

Figure 95. Tableau périodique des éléments. Les éléments atomiques testés comme inhibiteurs sont encadrés. Le cadre bleu indique que l'élément n'a aucun effet inhibiteur sur ST6GAL1 et ST3GAL1, un cadre vert signifie un effet modéré et un cadre rouge un effet fortement inhibiteur.

On retrouve la plupart de ces métaux inhibiteurs pour les sialyltransférases dans notre environnement. Le nickel est retrouvé au niveau des bijoux et dans l'atmosphère à des taux allant de

120-170 ng/ m³ dans les zones industrialisées et 6-17 ng/ m³ (Denkhaus and Salnikow, 2002). Des études épidémiologiques ont dénoté que le risque de développer un cancer est accru pour les mineurs ayant travaillé dans les mines d'extraction du nickel (Lightfoot et al., 2017; Shen and Zhang, 1994). Le nickel favorise la tumorigenèse en créant un stress oxydatif et en interagissant avec l'ADN, créant des cassures et modifiant l'expression de certains gènes (Costa et al., 1994). Le cobalt est un métal que l'on retrouve aussi dans l'environnement et est également cytotoxique et génotoxique (Smith et al., 2014). Il est fort probable qu'au-delà de leurs effets délétères connus sur la santé humaine, il soit capable de modifier la glycosylation de nos organismes. Cependant aucune étude n'a fait le lien entre ces pathologies liées à ces cations et le glycome.

Par ailleurs, l'effet des cations semblent être dépendant de l'enzyme. Le cobalt peut être utilisé comme co-facteur par certaines protéines enzymatiques. C'est le cas de la DPEase (D-psicose 3-epimerase) de *Clostridium bolteae* qui produit du D-psicose à partir de D-fructose. Cette enzyme est inactive sans cobalt (Co²⁺) et atteint son activité optimale avec une concentration aux alentours des 500 µM (Jia et al., 2014). Les auteurs ont également remarqué que le Mn²⁺ est aussi un potentialisateur de l'activité enzymatique alors que le Zn²⁺, Mg²⁺, Cu²⁺ et Ca²⁺ sont des inhibiteurs forts de cette enzyme. Le Fe²⁺, Ni²⁺ et Ba²⁺ n'ayant pas d'effets remarquables (Jia et al., 2014). Brièvement, les auteurs ont proposé que le cobalt soit un facteur permettant la stabilisation de la réaction d'isomérisation et dans la stabilisation de l'enzyme. En comparant ces données avec nos résultats, il serait intéressant d'étudier l'interaction de ces cations avec la protéine et déterminer si certains acides aminés peuvent former des complexes avec ces cations afin de modifier la catalyse enzymatique. Cet aspect suggère que les cations jouent une part non négligeable et encore peu connu en glycobiologie.

IV. Evolution moléculaire des ST6GAL et ST8SIA au cours de l'évolution

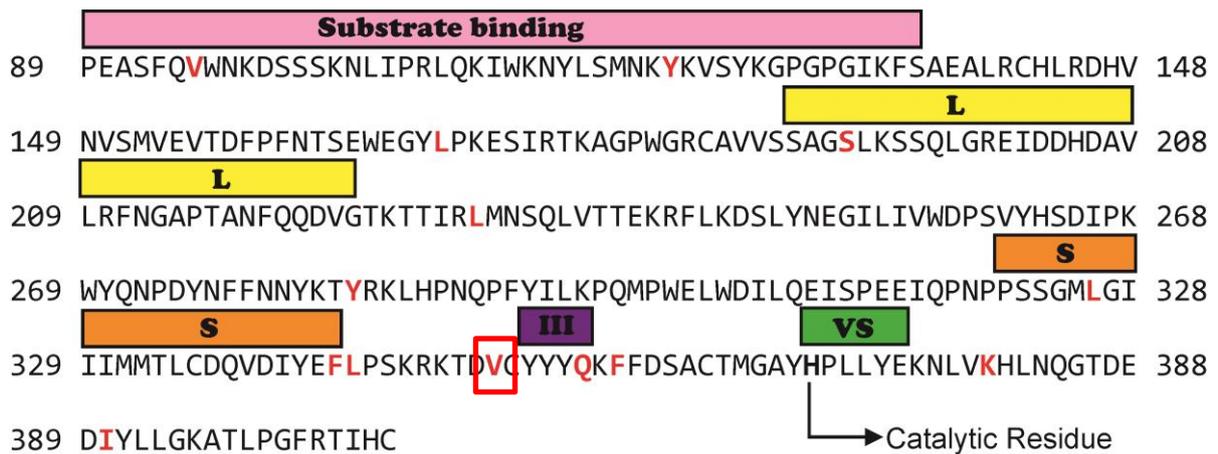
Nous avons analysé les différences de spécificité de la ST6GAL1 humaine et celle de *danio rerio* qui devrait, selon des analyses d'alignement de séquence, avoir conservé l'activité de la ST6GAL1 ancestrale. Nous avons démontré que la ST6GAL1 humaine avait une reconnaissance du LacNAc et du LacDiNAc alors que l'enzyme du poisson zèbre a une affinité restreinte au LacDiNAc. En 1999, il a été démontré que la ST6GAL1 de bœuf est également capable de sialyler des structures porteuses de LacNAc et de LacDiNAc (Mercier et al., 1999). Cette observation laisse supposer que les ST6GAL1 de mammifères ont acquis une néo-fonctionnalisation au cours de l'évolution. Les expériences d'alignement multiples de séquences de sialyltransférases ont mis en évidence la présence d'acides

aminés qui pourraient être déterminants pour l'affinité vis-à-vis des 2 types de disaccharides accepteurs appelés SDP. Plusieurs acides aminés ont été identifiés et celui qui présentait le plus haut score était une valine chez ST6GAL1 ou une leucine chez ST6GAL2 et ST6GAL1/2 (Figure 96A). Au niveau de la structure primaire de ST6GAL1, cette valine se trouve près du sialylmotif III et est proche du CMP sur la structure cristallographique, ST6GAL2 n'ayant pas encore été cristallographiée à ce jour (Figure 96B).

L'ensemble de ces résultats laissent supposer qu'une valine a remplacé la leucine au moment de l'apparition des mammifères et a permis à la ST6GAL1 de reconnaître des substrats porteurs de LacNAc. Le LacNAc sialylé est impliqué dans de nombreux phénomènes cellulaires et son apparition chez les mammifères a entraîné ST6GAL1 à acquérir une nouvelle fonction pour sialyler ses nouveaux substrats et a probablement conféré à ces cellules de nouvelles propriétés (Varki, 1997; Varki and Gagneux, 2012). En effet, chez le poisson zèbre, on retrouve principalement du LacNAc galactosylé (Gal β 1-4Gal β 1-4GlcNAc) et du LacDiNAc (Guérardel et al., 2006 ; Yamakawa et al. en cours de publication) alors que chez les mammifères on retrouve principalement du LacNAc. Il est fort probable que les enzymes B4GALNT3/4, chargés d'ajouter le GalNAc terminal pour former le LacDiNAc, ait été régulé négativement durant l'apparition des mammifères entraînant l'apparition de LacNAc par l'ajout de galactose par la B4GALT1/2/3. De fait, ST6GAL1 a subi des modifications pour pouvoir sialyler ce nouveau substrat mais ces hypothèses restent à vérifier.

L'ensemble de ces résultats est prometteur mais il reste cependant encore beaucoup de travail à réaliser. Tout d'abord, pour la détermination de l'activité enzymatique *in vitro* il faudrait réitérer les expériences utilisant le substrat radioactif car celles-ci n'ont été réalisées qu'une seule fois. Il faudrait également pouvoir utiliser un substrat protéique porteur de LacDiNAc dans le test MPSA ce qui permettrait de comparer les résultats obtenus avec l'asialofétuine et l'asialoorosomucoïde. Effectivement, il se pourrait que ces sialyltransférases reconnaissent la partie protéique comme l'ont prouvé de récentes études pour ST8SIA4 ou ST6GALNAC2 (Bhide et al., 2017; Samyn-Petit et al., 2000).

A



B

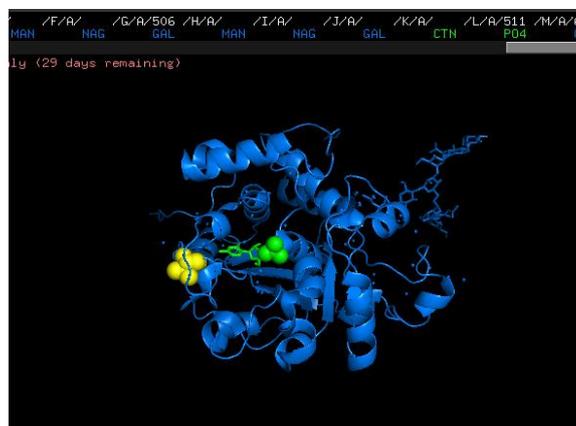


Figure 96. Représentation des SDP impliqués dans la reconnaissance de substrat accepteur chez les orthologues de ST6GAL1. A) Séquence protéique de ST6GAL1 humaine, les SDP potentiels sont indiquées en rouge, celui présentant le plus haut score et encadré en rouge. B) Structure cristallographique de ST6GAL1 avec la valine indiqué en boule jaune, le CMP indiqué en vert. Le glycanne accepteur se trouve en haut à droite de la structure sous la forme d'une chaîne carbonée.

Par la suite nous envisageons d'effectuer des expériences de mutagenèse dirigée sur cet acide aminé identifié et d'étudier l'affinité de ces mutants vis-à-vis du LacNac et du LacDiNac. L'ensemble des outils développés nous permettent d'utiliser plusieurs approches qui permettront de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse. *In vitro*, il nous faudra néanmoins utiliser une glycoprotéine porteuse de LacDiNac qui n'est pas encore disponible dans le laboratoire. Ces futurs résultats apporteront des connaissances accrues sur l'évolution moléculaire de ST6GAL1 et également sur le rôle précis de ces acides aminés identifiés dans la reconnaissance enzymatique pour différents substrats.

Dans l'équipe, nous nous sommes également intéressés à l'évolution moléculaire de la ST8SIA6 de *Danio rerio*. Chez l'Homme, la ST8SIA6 catalyse l'ajout d'un résidu d'acide sialique sur les O-glycannes (Teinturier-Lelièvre et al., 2005). Mon apport dans ce projet a été de caractériser l'activité enzymatique de l'orthologue humaine chez le poisson-zèbre. De études récentes menées par l'équipe de Yann Guérardel montrent la présence de motifs disialylés du type Neu5Gc α 2,8Neu5Gc ou de Neu5Ac α 2,8Neu5Gc mais pas de Neu5Ac α 2,8Neu5Ac ou de Neu5Ac α 2,8Neu5Ac signifiant que le Neu5Ac n'est pas utilisé comme substrat par les enzymes de la famille ST8SIA chez le poisson zèbre (Guérardel et al., 2006 ; Yamakawa et al. 2018 en cours de publication). Pour prouver cette spécificité envers les O-glycannes porteurs de Neu5Gc, nous avons choisi d'utiliser le test sur plaque et de sialyler l'asialofétuine avec du CMP-Neu5Gc ou du CMP-Neu5Ac et ST3GAL1 qui est spécifique des O-glycannes ou alors d'utiliser l'asialofétuine directement comme contrôle. La ST8SIA6 de *Danio rerio* a ensuite été incubée avec du CMP-SiaNAI et la révélation a été réalisée en utilisant l'anticorps anti-biotine couplé à la HRP et le TMB. Cette expérience a démontré que la ST8SIA6 de *Danio rerio* semblait plus active sur l'asialofétuine que sur des substrats sialylés. Ce résultat est tout à fait étonnant pour une enzyme faisant partie de la famille des ST8SIA car toutes transfèrent un acide sialique sur un autre résidu d'acide sialique. On peut envisager l'hypothèse que ST8SIA6 de *Danio rerio* ait une double activité ce qui la rendrait capable de sialyler un substrat non sialylé et de le resialyler par la suite. Cependant, une seule autre sialyltransférase du monde animal a été démontrée comme ayant la capacité de réaliser ces 2 types de sialylation. Il s'agit de la Cst II de *Campylobacter jejuni* qui sialylerait le substrat Gal β 1-3GalNAc et le Neu5Ac α 2,3Gal β 1,3GalNAc (Lee et al., 2011). Cependant les auteurs n'excluent pas l'hypothèse qu'il pourrait exister 2 isoformes de l'enzyme, chacune reconnaissant un type de substrat accepteur spécifique. En ce qui concerne la ST8SIA6 du poisson zèbre, il serait intéressant d'étudier les types de liaison entre l'acide sialique et le monosaccharide accepteur. De même, nous souhaitons étudier l'activité de cette enzyme sur des glycolipides afin de vérifier si cette enzyme n'a pas une activité sur ce type de substrat. Cette expérience pourrait être réalisée avec le test MPSA mais il faudrait tester si ce type de glycoconjugués est adsorbé dans le fond des puits.

V. Amélioration des prédictions bio-informatiques

La majorité des prédictions pour identifier l'impact d'un acide aminé sur la structure de l'enzyme ne se fait que par des approches de bio-informatique. Or le traitement de ces données est très chronophage pour l'utilisateur étant donné le nombre important de calcul à réaliser pour l'ordinateur. Partant de ce constat, il est quasiment impossible de déterminer l'impact d'un acide

aminé en relation avec la capacité de l'enzyme à former des oligomères ou d'étudier l'impact de l'environnement (pH, présence de cations, composition de la membrane lipidique, etc.) sur le devenir de l'enzyme. C'est pourquoi beaucoup d'espoir sont aujourd'hui placés dans le développement des ordinateurs quantiques capables de réaliser énormément plus de calculs pour un même laps de temps. Ces super-calculateurs se basent sur certaines propriétés des éléments quantiques pour réaliser ces calculs. Ces propriétés sont la superposition quantique, c'est-à-dire que la particule élémentaire peut être dans 2 états différents aux mêmes moments et l'intrication quantique, qui indique que 2 éléments quantiques reliés peuvent être dans 2 états opposés au moment de la mesure. L'exemple le plus connu est celui du spin, si une particule à un spin de $+1/2$, son associé à un spin de $-1/2$. De ce fait les données que l'ordinateur analyse ne sont pas une succession de bits de 1 ou de 0 mais sont à la fois 0 et 1 ce qui augmente considérablement la vitesse de calcul (<https://www.institut-pandore.com/physique-quantique/informatique-ordinateur-quantique/>). De ce fait, les chercheurs pensent qu'utiliser ce type d'ordinateur permettra de mieux modéliser les structures des protéines et possiblement les associer à d'autres structures, par exemple l'interaction d'une sialyltransférase vis-à-vis d'un glycanne sur une protéine particulière et le tout sur la membrane de l'appareil de Golgi.

CONCLUSION GENERALE :

Dans cette thèse, j'ai mis au point différentes approches afin d'étudier les sialyltransférases présentes au sein de lysat mais également produite dans le milieu de culture. Pour ces mises au point j'ai utilisé la ST6GAL1 et ST3GAL1 humaine qui sont les enzymes les plus étudiés et parmi les plus actives. J'ai déterminé la composition de tampon RIPA et le temps de transfection optimal pour obtenir la plus grande quantité d'enzyme. En ce qui concerne les enzymes tronquées, j'ai déterminé la troncature qui permettait d'obtenir une sécrétion et une activité optimale. Ces enzymes ont été utilisées pour développer de nouveaux outils *in vitro* et *in cellulo* exploitant les propriétés du CMP-SiaNAI synthétisé par l'équipe du Dr. Yann Guérardel. Ce CMP-SiaNAI est capable, par chimie-click, de former une liaison covalente avec un tag type biotine. Après avoir prouvé que les sialyltransférases utilisent le CMP-SiaNAI avec la même affinité que le CMP-Neu5Ac, nous avons développé un test sur plaque sensible, spécifique, rapide et peu coûteuse nommé MSPA (MicroPlate Sialyltransferase Assay), qui a permis d'étudier l'effet de cations sur l'activité enzymatique. L'ensemble de ces outils ont permis d'apporter des éléments de compréhension aux différentes thématiques de l'équipe. De ce fait, nous avons pu étudier l'évolution moléculaire de ST6GAL1 et ST8SIA6 et mieux comprendre la relation qui existe entre leur structure et leur fonction. Les perspectives d'étude sont nombreuses

quant à l'évolution de ces enzymes ou également d'autres sialyltransférases et ces outils seront un atout non négligeable. Ces travaux de thèse sont un bon exemple que la trans-disciplinarité est un point essentiel dans tous sujets de recherche où chaque domaine permet d'apporter des connaissances et des outils pour répondre à une problématique.

Participation collaborative

A. Au sein de l'équipe : Etude de la localisation d'une isoforme de la β 4GALNACT2

La B4GALNT2 est impliquée dans la synthèse de l'antigène Sd^a, la sous-expression de cette enzyme entraîne l'apparition du SLe^x et favorise la tumorigenèse (Groux-Degroote et al., 2018). Deux isoformes ont été caractérisées pour cette enzyme. La majeure est la forme courte, l'autre est une forme longue. La différence entre ces 2 isoformes provient d'une troncature côté *N*-terminal, la forme longue présentant une queue cytoplasmique de 66 acides aminés, particulièrement longue pour une glycosyltransférase. Dans cette étude, l'objectif est de démontrer que ces 2 isoformes ont une localisation subcellulaire différente en utilisant des approches de microscopie confocale et grâce à des constructions couplées à des fluorophores, l'équipe a démontré que la forme longue se retrouve le *trans*-Golgi (comme l'isoforme courte) et au sein de vésicules alors que la forme courte se localise exclusivement au sein de l'appareil de Golgi.

Mon implication dans ce projet a été de confirmer que la forme longue de la B4GALNT2 peut également se retrouver au niveau de la membrane plasmique. Les cellules cancéreuses de colon LS174T exprimant stablement soit la forme longue soit la forme courte de la B4GALNT2 ont été utilisées (Malagolini 2007). La première expérience réalisée par l'équipe a été une approche d'antibody uptake consistant à incuber les cellules LS174T avec une forte concentration en anticorps anti-B4GALNACT2 pendant 3 h pour ensuite fixer les cellules et les incuber avec un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome. La présence de signal intracellulaire montre que la forme longue de la glycosyltransférase peut se retrouver au niveau de la membrane plasmique où l'anticorps primaire a pu se fixer et ensuite être internalisé (Figure 97).

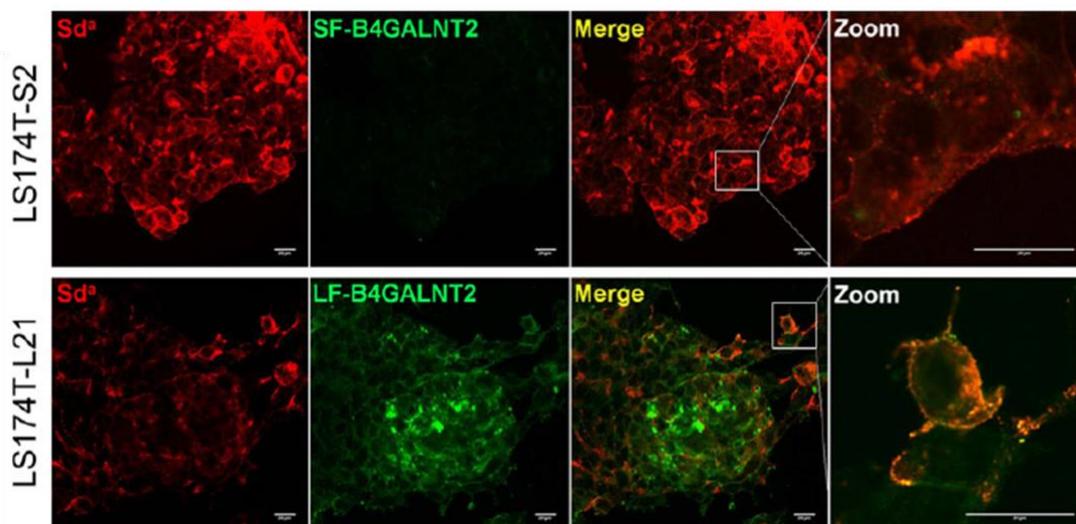


Figure 97. Antibody uptake des cellules LS174T transfectées stablement avec la forme longue (LS174T-L21) ou courte (LS174T-S2) de la B4GALNACT2. Les LS174T-L21 et les LS174T-S2 ont été cultivées sur des lamelles de verre puis incubées pendant 3 h avec un anticorps anti- β 4GalNAct II, fixées et incubées avec un alexa-fluor 488 anti-lapin (vert). En parallèle, un marquage de l'antigène Sd^a a été réalisé comme contrôle en utilisant un anticorps anti-Sd^a suivi d'une incubation avec un alexa-fluor 568 anti-chèvre (rouge). Aucun marquage n'est observé pour l'incubation avec les LS174T-S2 alors que les LS174T-L21 ont un marquage membranaire et vésiculaire. Echelle : 20 μ m. Tiré de (Groux-Degroote et al., 2018)

Pour confirmer ce résultat, j'ai réalisé une expérience de biotinylation des protéines de la surface cellulaire. Pour cela, j'ai incubé les cellules LS174T pendant 3 h à 37°C avec une sulfo-biotine qui forme des ponts disulfures avec les protéines présentes au niveau de la membrane plasmique. Après lyse cellulaire, le lysat est incubé avec des billes de streptavidine pour purifier les protéines biotinylées. Après relargage des protéines purifiées, l'éluat est soumis à un SDS-PAGE et un Western-blot en utilisant un anticorps anti-B4GALNACT2. Seules les LS174T transfectées avec la forme longue ont permis de visualiser un signal démontrant que seule la forme longue s'est retrouvée au niveau de la membrane plasmique pour être biotinylée (Figure 98).

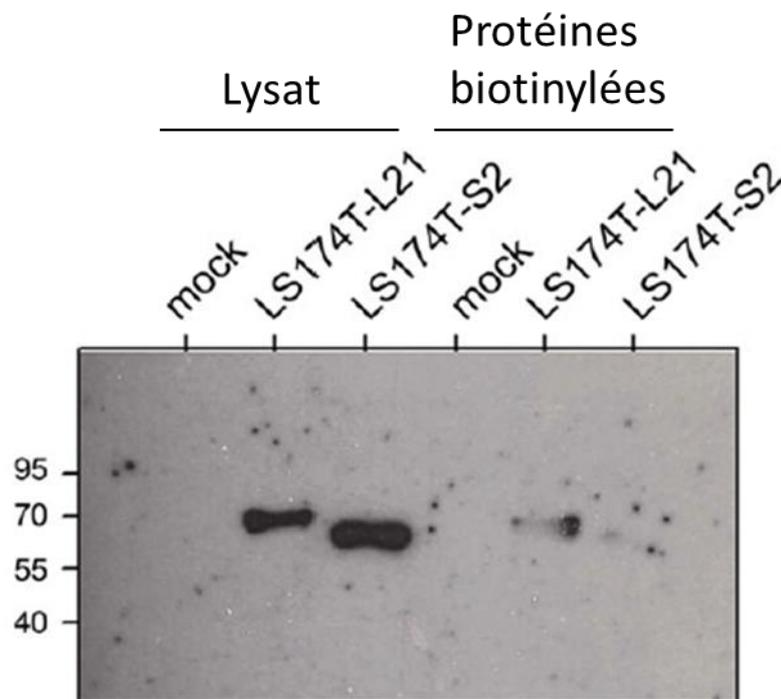


Figure 98. Biotinylation de surface des LS174T mock, transfectées avec la forme longue (LS174T-L21) ou courte (LS174T-S2). Les cellules LS174T-mock, LS174T-L21 et LS174T-S2 ont été cultivées jusqu'à 70% de confluence et incubées avec la sulfo-NHS-SS-biotine pendant 3 h à 37°C. Après lyse, 1 mg de protéines a été incubé à 4°C sur la nuit avec des billes de streptavidine et soumise à un SDS-PAGE et à un Western-blot. Vingt microgrammes de lysat (lysat) et les protéines biotinylées ont été incubées avec un anticorps anti-B4GalNAct II. Aucun marquage n'est visible sur les LS174T-mock et

les LS174T-S2 alors que la longue forme est détectée dans les LS174T-L21. Tiré de (Groux-Degroote et al., 2018)

Ces travaux ont été récompensés par une publication dans FEBS Journal en Juillet 2018.

B. Au sein de l'unité : Etude de l'activité des sialyltransférases par RMN (Résonance Magnétique Nucléaire)

L'étude de l'affinité des sialyltransférases vis-à-vis des différents substrats donneurs est d'une importance cruciale. Non seulement au niveau de l'évolution des sialyltransférases et l'implication des acides sialiques dans l'évolution humaine (pour revue voir Varki *et al.* 2017 (Varki, 2017)) mais également au niveau de développement tumoral où il est décrit une présence plus importante de Neu5Gc sur les cellules tumorales (Samraj et al., 2014). Nous avons tenté d'exploiter la RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) du phosphore pour étudier cette problématique. Cette technique a déjà été utilisée pour mettre au point la synthèse des CMP-acide sialiques par l'équipe du Dr. Guérardel (Gilormini et al., 2016b). La RMN nous permet de visualiser les composés porteurs de phosphore dans la solution analysée. Dans le cas de la réaction de sialylation il y en a 2, le CMP-acide sialique et le CMP libéré après réaction. On repère également le Pi issu de l'hydrolyse du PPI par une phosphatase afin de renverser l'équilibre de la réaction pour éviter que la formation inverse ne se forme. L'objectif est de quantifier indirectement le transfert de l'acide sialique *via* la libération du CMP. Cependant il faut prendre en compte l'hydrolyse naturelle de l'acide sialique activé et l'activité résiduelle associée au milieu de culture dans lequel baigne nos sialyltransférases recombinantes, c'est pourquoi nous avons utilisé un milieu mock issu de cellules transfectées avec un plasmide vide et l'avons comparé au signal émis avec le milieu contenant la sialyltransférase. Dans cette expérience nous avons incubé 5 mM de *N*-glycopeptide, 10 mM de CMP-Neu5Ac, 50 mM de Tris contenant 10 % de D₂O durant 12 h et l'enzyme ST6GAL1 (Figure 99A). On remarque qu'à T = 0 h, on observe uniquement du CMP-Neu5Ac et du Pi initialement présent lors de la synthèse du CMP-Neu5Ac. A partir de 2 h, on observe l'apparition de CMP et la disparition progressive du CMP-Neu5Ac. Cette expérience démontre qu'il est possible d'observer l'apparition du CMP au cours du temps. Cependant, en répétant l'opération avec un milieu mock et en comparant avec la condition avec ST6GAL1, la même cinétique est observée, l'effet de l'enzyme n'est donc pas suffisant pour être visible et la dégradation du CMP-Neu5Ac est uniquement due à l'hydrolyse naturelle du CMP-Neu5Ac (Figure 99B). Cette approche a pour le moment été laissée de côté.

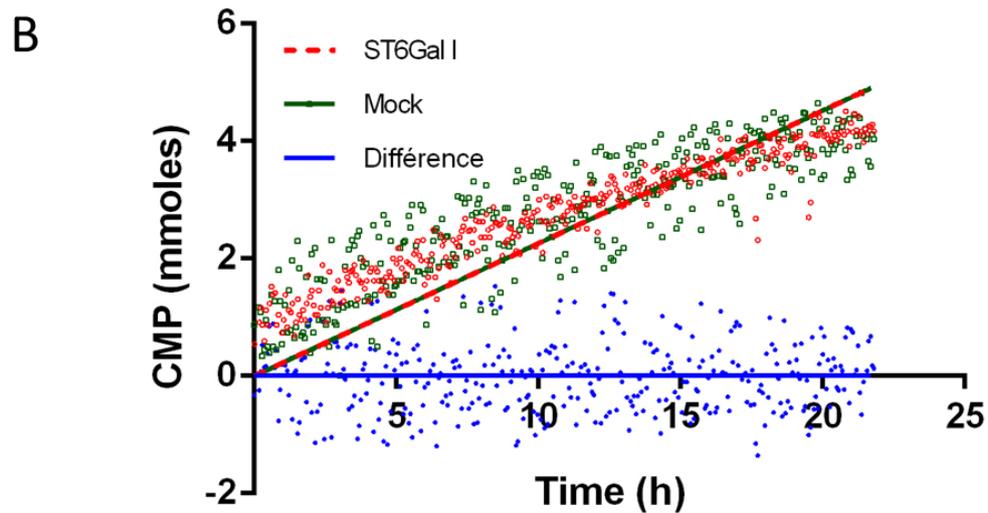
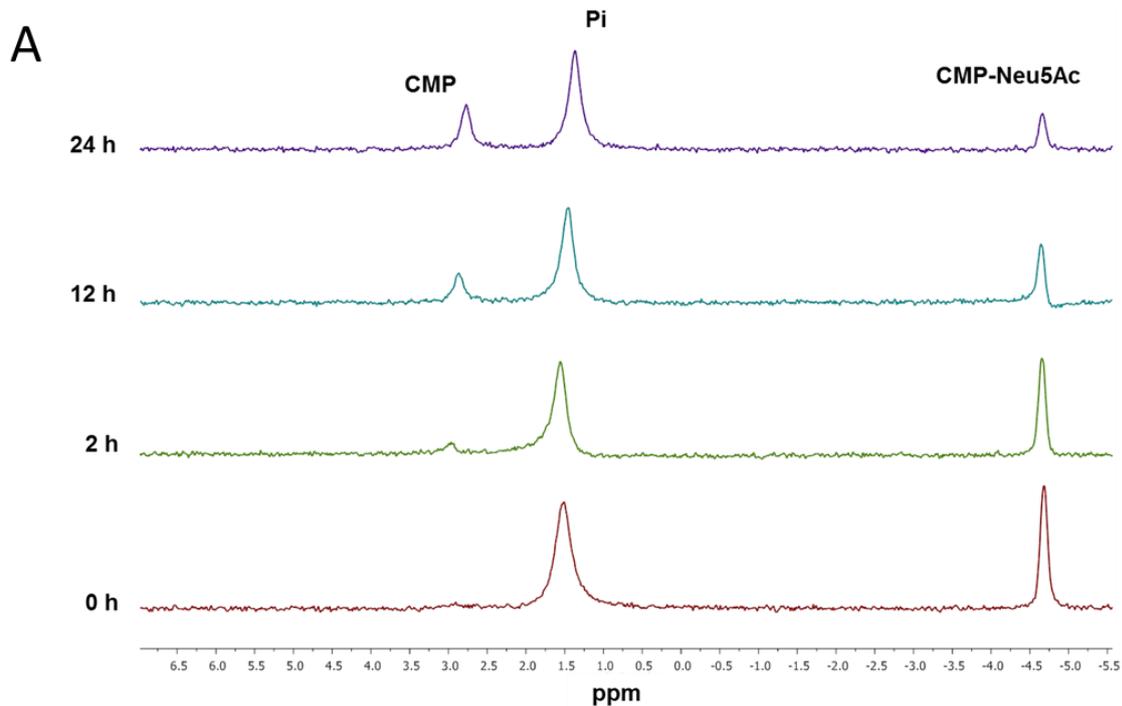


Figure 99. Etude de l'activité de ST6GAL1 par RMN. A) Spectres de RMN du phosphore à T = 0h et après 2, 12 et 24h de sialylation. Cinq mM de *N*-glycopeptide, 10 mM de CMP-Neu5Ac, 50 mM de Tris contenant 10 % de D₂O et ST6GAL1 ont été incubés durant 12 h à 37°C. B) Le signal émis par le phosphore du CMP dans la condition mock (en vert) et la condition avec ST6GAL1 (en rouge). La différence entre les 2 conditions est représentée en bleu. Les droites de tendance ont été tracées dans la couleur appropriée.

C. A l'international : Effet du potentiel oxydatif sur l'oligomérisation de ST6GAL1 et son activité.

Les cellules cancéreuses humaines présentent des profils altérés de glycosylation qui peuvent être partiellement dû à l'hypoxie tumorale et l'expression de facteurs HIFs exprimés dans des conditions

hypoxiques (Peixoto et al., 2016). Dans ce contexte, l'équipe de Kellokumpu a cherché à étudier l'impact du pH golgien et du potentiel d'oxydo-réduction sur la structure et l'activité enzymatique de ST6GAL1. Dans ce travail, des données cristallographiques et des expériences de mutagenèse dirigée ont démontré que des cystéines exposées à la surface protéique sont impliquées dans la formation d'oligomères et qu'une modification du potentiel redox supprime les ponts disulfure impliquant ces cystéines et rend incapable ST6GAL1 de former un hétéromère avec la B4GALT1. Notre implication dans ce travail a été de vérifier l'activité de ST6GAL1 mutée sur ces cystéines (C353A et C406A). Nous avons utilisé le CMP-[¹⁴C]Neu5Ac et le test MPSA pour déterminer l'activité de ces différentes constructions et observer une perte de l'activité des mutants (Figure 100A/B). Cette étude est soumise à publication.

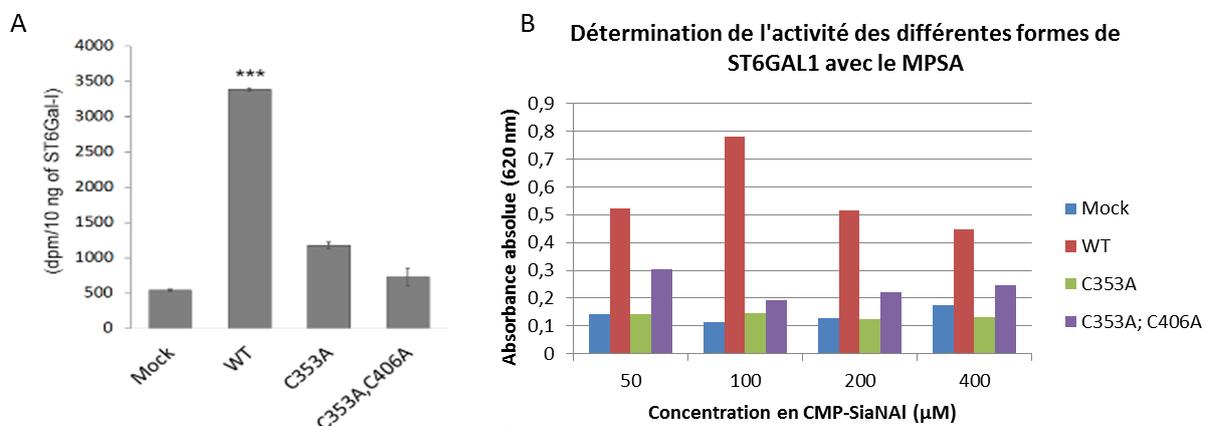


Figure 100. Activité des différentes formes de ST6GAL1. A) Les lysats cellulaires contenant l'une des formes de ST6GAL1 ont été incubés avec 50 µM de CMP-Neu5Ac dont 50 000 DPM de CMP-[¹⁴C]Neu5Ac et de l'asialofétuine. Après une incubation de 16 h à 37°C, les glycoprotéines ont été précipitées et la radioactivité quantifiée. Après normalisation, le résultat est exprimé en DPM/ 10 ng de protéines. B) Ces mêmes lysats cellulaires ont été incubés avec différentes concentrations en CMP-SiaNAI et 400 ng d'asialofétuine adsorbée au fond des puits pendant 6 h à 37 °C.

D. A l'international : Etude de l'effet inhibiteur de certaines molécules sur ST6GAL1 et ST3GAL1

Les glycosyltransférases et en particulier les sialyltransférases jouent un rôle considérable dans la plupart des processus biologiques tant physiologiques que pathologiques. A ce titre, ces enzymes apparaissent comme des cibles thérapeutiques majeures. Il s'agit aussi d'un défi considérable reposant sur une meilleure compréhension du fonctionnement de ces enzymes au niveau atomique. Le Pr. Skropetta développe des approches de biologie computationnelle pour l'étude des sialyltransférases (Montgomery, Yu 2017 chapter 2). Plusieurs molécules mimant le donneur de sucre ont été synthétisées dans son équipe, notre participation à ces études a consisté à étudier leurs

effets sur l'activité enzymatique des ST6GAL1 et ST3GAL1. Pour cela, nous avons incubé nos enzymes produites dans le milieu de culture des cellules HEK293 transfectées transitoirement, avec 100 μM de CMP-NeuAc (50 000 DPM de CMP-[^{14}C]Neu5Ac), avec de l'asialofétuine comme substrat accepteur et 100 μM de chacun des composés inhibiteurs durant 2 h et avons quantifié l'acide sialique radioactif transféré sur la glycoprotéine (Figure 101).

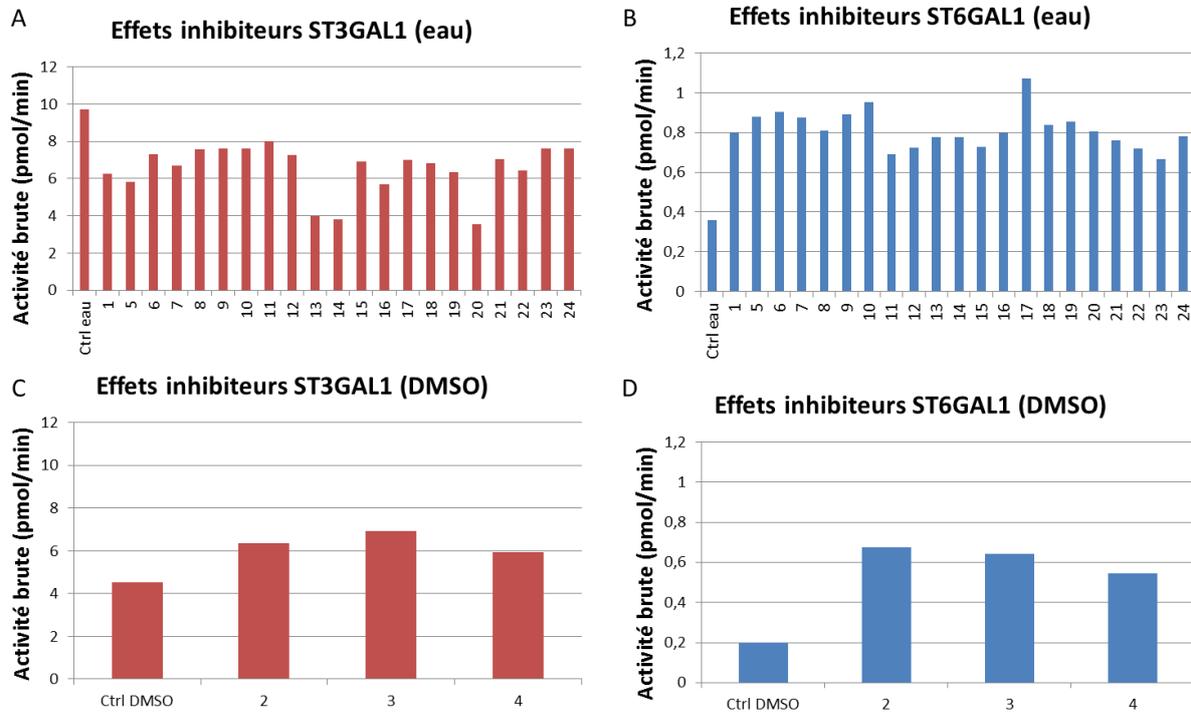


Figure 101. Activité des molécules synthétisées par l'équipe du Pr. Skropetta sur l'activité enzymatique de ST3GAL1 et ST6GAL1. L'incubation a été réalisée avec 60 μg d'asialofétuine, 100 μM d'acide sialique dont 50 000 DPM de CMP-[^{14}C]Neu5Ac et 100 μM de composés avec 12 μL de milieu de culture contenant ST3GAL1 (A et C) ou ST6GAL1 (B et D). Certains composés ont été solubilisés dans le DMSO et ont donc été comparés avec un contrôle DMSO (C et D). n=1.

Les résultats tendent à démontrer que certains inhibiteurs ont un effet mais l'expérience est à réitérer. L'utilisation du test MPSA pour confirmer ces premières observations est envisagée.

Matériels & méthodes

I. Construction des plasmides permettant l'expression de sialyltransférases recombinantes.

Des ADNc codants les différentes formes des enzymes ont été utilisés. Les formes tronquées ont été insérées dans le vecteur p3xFlagCMV9 alors que les formes complètes dans le plasmide P3xFlagCMV10 (Figure 102). Ces vecteurs possèdent un promoteur CMV permettant une production forte de l'ADNc et permettent d'accoler du côté N-terminale de la protéine recombinante un tag 3xFLAG. Ce choix permet de tagguer la protéine à l'opposé du domaine catalytique, évitant potentiellement d'impacter l'activité catalytique de la protéine. Par ailleurs, nous avons vérifié dans le cas des formes pleine longueur de ST3Gal I étiquetées côté N-terminal que le tag n'avait pas d'effet sur la localisation Golgienne de la protéine (voir p. 117).

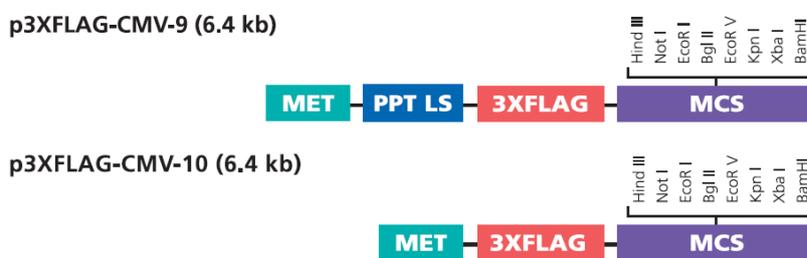


Figure 102. Schéma des vecteurs CMV9 pour les formes tronquées et CMV10 pour les formes pleines taille de l'enzyme. La séquence nucléotidique de la méthionine (MET) initie la traduction, la séquence PPT LS favorise la sécrétion de l'enzyme *via* la voie antérograde, la séquence 3XFLAG permet de marquer l'enzyme, le MCS (Multiple Cloning Site) est utilisé pour insérer la séquence nucléotidique de notre séquence codante d'intérêt.

L'amplification de l'ADNc a été réalisée par PCR dans un volume de 50 μ L contenant 2 μ M de chaque amorce oligonucléotidique, 150 μ M de dNTP et 0.6 unités de Hi-Taq polymérase. La PCR de 25 cycles comprend d'une étape de dénaturation à 98°C pendant 10 secondes, d'une étape d'hybridation de 20 secondes à la température d'hybridation (T_m) indiquée et d'une étape d'élongation de 15 secondes à 72°C (Tableau 8). La PCR est précédée d'une primoétape de dénaturation de 30 secs à 98°C et finalisée par une étape d'élongation de 5 min à 72°C.

Tableau 8. Séquence des différentes amorces utilisées lors des PCRs. Le site de restriction est représenté en gras (*KpnI* : AAGCTT ; *BamHI* : GGATCC ; *EcoRI* : GAATTC).

Nom de l'amorce	Séquence de l'amorce	Vecteur	T_m (°C)
Sens hST3GAL1	5'-AAAAAGCTTGTGACCCTGCGGAAGAGGACCCTG-3'	P3xFlagCMV10	66.9
Sens	5'-AAAAGCTTAGGCCTTGACCTGCACCCACTG-3'	P3xFlagCMV9	65.7

Δ56hST3GAL1			
Antisens hST3GAL1	5'-AAAGGATCCCTTCACTGCGTCATCTCCCCTTG-3'	P3xFlagCM9/10	65.7
Sens hST6GAL1	5'-AAAAAGCTTCACACCAACCTGAAGAAAAAGTTC-3'	P3xFlagCMV10	59.4
Sens Δ27hST6GAL1	5'-AAAAAGCTTGAAAAGAAGAAAGGGAGTTACTATG-3'	P3xFlagCMV9	58.4
Sens Δ37hST6GAL1	5'-AAAAAGCTTTTTAAATTGCAAACCAAGGAATTCC-3'	P3xFlagCMV9	57.2
Sens Δ56hST6GAL1	5'-AAAAAGCTTGGGTCTGATTCCCAGTCTG-3'	P3xFlagCMV9	59.9
Sens Δ73hST6GAL1	5'-AAAAAGCTTGGCCGCCAGACCCTCGG-3'	P3xFlagCMV9	64.3
Sens Δ89hST6GAL1	5'-AAAAAGCTTGAGGCCTCCTCCAGGTG-3'	P3xFlagCMV9	61.3
Sens Δ107hST6GAL1	5'-AAAAAGCTTAGGCTGCAAAGATCTGGAAG-5'	P3xFlagCMV9	58.9
Antisens hST6GAL1	5-AAAGGATCCTTAGCAGTGAATGGTCCGGAAG-3'	P3xFlagCM9/10	63
Sens Δ33drST6GAL1	5'-AAAAAGCTTCTTTGTGCTGAAAACAGCATTCTG-3'	P3xFlagCMV9	60.8
Sens Δ135drST6GAL1	5'-AAAAAGCTTGCCAGACGGAGAGGAGATAT-3'	P3xFlagCMV9	60.1
Antisens drST6GAL1	5'-AAAGAATCAACAGTTCCTCAGATTAGG-3'	P3xFlagCMV9/10	57.8
Q5-ST3Gal1-F- G288D	5'-GACTTGTACGACTTCGGGGCA-3'	PmCherry	56.3
Q5-ST3Gal1-F- G288A	5'-GACTTGTACGCCTTCGGGGCA-3'	Pmcherry	58.3
Q5-ST3Gal1-Rev	5'-CACCTCATCGCAGACATG-3'	Pmcherry	50.3
5'p3Flag	5'-TTGACGCAAATGGGCGGTAG-3'	PCR sur colonie	53.8
3'p3Flag	5'-TTGCCCTTGCTCCATACCAC-3'	PCR sur colonie	56.3

Les fragments amplifiés ont été extraits d'un gel d'agarose 0.8 % et sous clonés dans le vecteur d'expression p3xFlagCMV9 par le mix composé de 2 μL de vecteurs et 10 μL d'ADNc et 1

unité de ligase T4 et incubée sur la nuit à 4°C. Des bactéries de type *E. coli* TOP10 ont ensuite été transformées dans un mélange composé de 50 µL de bactéries et 5 µL du mélange de ligation et incubées 20 min sur glace, 30 secs à 42°C et 2 min sur glace. Les colonies ont ensuite été cultivées dans des géloses de LB avec 50 µg/ mL d'ampicilline. Les colonies ont ensuite été soumises à une PCR sur colonie pour contrôler la présence du plasmide contenant 0.1 µM d'amorce 5'p3 Flag (5'-TTGACGCAAATGGGCGGTAG -3') et 3'p3Flag (5'- TTGCCCTTGCTCCATACCAC – 3') et 1X de Taq&Go Mastermix avec des cycles de 30 secs à 94°C, 30 secs à 50°C et 1 m 10 secs à 72°C et une première étape de dénaturation de 5 min à 94°C et une dernière étape d'élongation de 5 min à 72°C. Après extraction du plasmide des clones positifs, la construction finale a été contrôlée par des digestions enzymatiques et séquençage par la société GATC Biotech.

Pour la réalisation des plasmides permettant l'expression des formes de ST3GAL1 mutées, le protocole du kit Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit (New England Biolabs) a été suivi. Des PCRs permettant l'amplification du plasmide entier ont été réalisées avec 10 µM d'amorces contenant la séquence mutée, la Q5 Hot-Start High Fidelity polymerase et son tampon pendant 25 cycles. Ces cycles comprennent une étape de dénaturation de 10 secs à 98°C, puis une étape d'hybridation à 54°C pendant 30 secs et enfin une étape d'élongation à 72°C pendant 30 secs. Ces 25 cycles ont été précédés d'une dénaturation initiale de 98°C pendant 30 secs et suivis d'une élongation finale à 72°C pendant 2 min. Les plasmides ont ensuite été circularisés par l'action successive de kinase, qui phosphorylent le côté 3' des segments amplifiés, et l'action de ligase qui le côté 3' au 5' du plasmide. Enfin, des bactéries *E. coli* TOP10 ont été transformées comme indiqués précédemment.

Les plasmides ont ensuite été extraits en suivant le protocole du kit Nucleobond Xtra Midi de Macherey-Nagel. Une colonie bactérienne a été cultivé dans 100 mL de milieu LB (Bacto tryptone/ extrait de levure/ NaCl : 10/ 5/ 5) complété avec 50 µg/mL sur la nuit à 37°C. La solution est ensuite centrifugée et le surnageant retiré. Le culot est repris dans une solution de suspension contenant des inhibiteurs de DNase. Les bactéries sont ensuite lysées et l'ADN génomique précipité. La solution est ensuite filtrée afin que l'ADN plasmidique soit associé au filtre. Après des étapes de lavage, l'ADN plasmidique est élué et précipité dans 3.5 mL d'isopropanol et vortexé à 10 000 RPM pendant 45 min à 4°C. L'ADN est ensuite solubilisé dans l'eau et la concentration a été déterminée par le spectrophotomètre Denovix.

II. Culture cellulaire

Les cellules HEK293 (ATCC CRL-1573) ainsi que les cellules CHO-Lec2 (ATCC CRL-1736), CHO-Lec8 (ATCC CRL-1737) et CHO-K1 (ATCC CL-61) et les LS174T (ATCC CL-188) ont été cultivées dans du milieu DMEM (Lonza) complétement avec 10% de sérum de veau fœtal (Lonza) et sous 5% de CO₂.

Les cellules HEK293 ont été transfectées à 70% de confluence avec 2 µg de plasmide et en utilisant de la lipofectAMINE (Invitrogen) dans du milieu ultraMEM (Lonza) selon les recommandations du fabricant. Trente-six heures post-transfection, le milieu de culture a été récupéré, centrifugé afin d'éliminer les débris cellulaires et utilisés comme source enzymatique pour les réactions de sialylation.

III. Synthèse du CMP-SiaNAI et suivi de la sialylation par RMN

L'acide sialique (0.028 mmol) et le cytidine-5'-triphosphate (15 mg, 0.028 mmol) ont été dissous dans du Tris-HCl (100 mM, pH 8,8) contenant 20mM MgCl₂ (300 µL). La CMP-acide sialique synthétase de *N. meningitidis* groupe B (EC 2.7.7.43, 1U) et la pyrophosphatase inorganique de *Saccharomyces cerevisiae* (EC3.6.1.1.1, 1U) ont ensuite été ajoutés au mélange, ainsi que du D₂O (30µL). Le volume final de 650 µL a été atteint par l'ajout de tampon Tris-HCl et/ou d'ammoniaque pour ajuster le pH à la valeur désirée. La réaction a été effectuée à 37°C pendant 40 min à 1 h selon le support. L'achèvement de la réaction a été évalué par une analyse *in situ* par RMN- P³¹. Ces analyses ont été réalisées sur un spectromètre Brüker 400MHz SB Advance II (Brüker Biospin SA, Wissembourg, France) équipé d'une sonde BBO (BB/1H/2H), utilisant la séquence d'impulsions zg. La procédure synthétique décrite ci-dessus a été appliquée directement dans un tube RMN de 5 mm. Après stabilisation de la température, un spectre RMN t₀^{31P} a été acquis avant d'ajouter les enzymes. Lors de l'ajout simultané de CSS et de pyrophosphatase inorganique, des spectres ont été acquis toutes les 10 minutes, ce qui a permis d'obtenir des instantanés de la réaction en temps réel. Chaque espèce phosphorylée dans le milieu réactionnel a été identifiée et quantifiée au cours de la réaction. A la fin, la solution obtenue de CMP-Sia a été refroidie jusqu'à 4°C et directement utilisé dans les essais de sialylation.

IV. Réaction de sialylation en utilisant du CMP-[¹⁴C]Neu5Ac

La réaction de sialylation a été réalisée dans 25 µL de tampon cacodylate (100 mM de cacodylate de sodium, 10 mM de MnCl₂, 0.1% de triton CF-54, pH 6.2), 60 µg de glycoprotéines acceptrices,

différentes concentrations en CMP-acide sialique dont 100 000 ou 40 000 DPM (indiqué sous la figure) de CMP-[¹⁴C]Neu5Ac et 10 µL de milieu de culture contenant la sialyltransférase ou non (mock). Après une incubation à 37°C pendant 6 h, la réaction a été stoppée par addition de 1 mL d'acide phosphotungstique 5% dissous dans de l'HCl 2 M et laissée sur la nuit à -20°C. Une filtration sur des filtres de microfibre de verre (GF/A Whatmann) et des lavages (TCA, H₂O) ont été effectués et, après séchage, les désintégrations du radio-isotope porté par les acides sialiques liés à la glycoprotéine ont été révélées par 3 mL liquide de scintillation ultimagold (PerkinElmer) et comptabilisées par l'appareil Hidex 300 SL. Le nombre de désintégration par minute a été converti en pmol/min. Après traitement par l'équation de Michalis-Menten et traçage de la courbe du même nom *via* le logiciel GraphPad, les valeurs de Km et Vmax de l'enzyme ont été déterminées vis-à-vis du substrat.

V. Quantification du SiaNAI transféré par analyse en micro-LC/ESI-MRM-MS₃

La réaction de sialylation a été réalisée en incubant 200 µg de fétuine désialylée et du CMP-SiaNAI à la concentration indiquée dans du tampon cacodylate et 6.5 µL de milieu de culture contenant les sialyltransférases recombinantes ou un milieu mock dans un volume final de 30 µL. La réaction a été incubée 6 h à 37°C et a été stoppée avec l'addition d'1 mL d'acide phosphotungstique 5% dissous dans l'HCl 2 M. Après une précipitation sur la nuit à -20°C, les protéines resialylées ont été lavées 3 fois avec de l'acide trichloracétique 10%. Le lien glycosidique liant l'acide sialique et le monosaccharide accepteur a été hydrolysé avec 100 µL d'acide trifluoroacétique (TFA) après incubation à 80°C pendant 2 h et évaporation dans un concentrator 5301 (Eppendorf). La dérivation des acides sialiques a été réalisée 2 h à 50°C dans l'obscurité avec 32 µg de DMB (1,2-diamino-4,5methylenedioxybenzene), 0.5 M de β-mercaptoéthanol, 9 mM de Na₂S₂O₄, 5 mM de TFA dans un volume final de 40 µL. Enfin, les échantillons ont été stockés à -20°C à l'obscurité avant l'analyse. Celle-ci a été réalisée en mode ion positif sur un amaZon speed ETD équipé d'une trappe de spectrométrie de masse avec une source ionisante en électrospray (ESI) et contrôlé par le logiciel Hystar (Bruker Daltonics). L'identification des fragments ioniques MS₂ est basée sur les analyses publiées récemment sur le couple acide sialique-DMB en MS/MS (Baumann et al., 2015). La séparation du couple acide sialique-DMB a été finalisée sur un système de micro LC (Prominence LC-20AB, Shimadzu). Les échantillons ont été dilués 5 fois dans 0.1% d'acide formique et 5 µL de la dilution ont été envoyés sur la colonne analytique (luna3u C18 (2) 100 Å 150 x 1.00 mm, Phenomenex) avec une élution isocratique d'acétonitrile : méthanol : eau (4 :6 :90, v/v) à un flux de

60 $\mu\text{L}/\text{min}$. Le suivi de la réaction de la MS_3 a été utilisé pour une quantification de l'acide sialique couplé au DMB avec un voltage du spray ionique à 4500 V. La quantification absolue a été calculée en comparant l'intensité de l'ion en référence aux échelles établies pour les dérivés d'acide sialique couplés au DMB.

VI. SDS-PAGE et analyse en Western-blot

Pour vérifier la production des sialyltransférases dans les HEK293 transfectées, 30 μL de milieu de culture ont été bouillis avec 10 μL de solution de Laemmli (235 mM Tris-HCl, pH 6.8, 8% de SDS, 40% de glycérol, 10% de β -mercaptoéthanol et 0.01% de bleu de bromophénol) durant 10 min à 95°C puis séparés dans un gel de polyacrylamide 8% et transférés sur une membrane de nitrocellulose. Un contrôle de chargement a été réalisé avec un marquage au rouge ponceau. Ensuite, la membrane a été saturée avec 5 % de lait dans du TBST (1 \times TBS avec 0,05 % Tween 20) pendant une heure et incubée toute la nuit à 4°C avec 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'anticorps anti-flag (Sigma). Après 3 lavages au TBST, la membrane a ensuite été incubée avec un anticorps IgG anti-souris conjugué à la peroxydase (GE Healthcare) dilué au 1/10.000. Le signal a été détecté à l'aide du réactif chimioluminescent ECL 2 (thermo-scientifique) et d'une caméra pour chimioluminescence (Vilber Lourmat).

Pour visualiser l'activité enzymatique des sialyltransférases recombinantes $\Delta\text{ST3GAL1}$ ou $\Delta\text{ST6GAL1}$ sur les différents accepteurs de glycoprotéines en utilisant le donneur d'acide sialique non naturel CMP-SiaNAI, nous avons établi une approche Western blot. Des réactions de sialylation ont été réalisées avec 8.5 μL de milieux de culture de cellules HEK293 transfectées contenant soit ST3GAL1 ou ST6GAL1, soit aucune enzyme (mock) pendant 4 heures avec 100 μM de CMP-SiaNAI fraîchement préparé et 50 μg d'un accepteur glycoprotéique (fétuine, asialofétuine, asialoorosomucoïde ou aucun accepteur exogène). Après la réaction de sialylation, la chimie click a été utilisée pour lier par covalence le groupement alcyne avec l'azide-PEG3-biotine (Sigma). Brièvement, 20 μg de glycoprotéines sialylées ont été incubées 1 heure à 25°C avec 300 μM de CuSO_4 , 593 μM BTAA, 252 μM d'azido-biotine et 2.475 mM d'ascorbate de sodium dans un volume final de 20 μL complété par du PBS. Après la chimie click, les 20 μg de glycoprotéines ont été bouillies 5 minutes dans une solution de Laemmli. Les échantillons ont ensuite été séparés dans un gel de polyacrylamide à 8 %, transférés sur une membrane de nitrocellulose et une coloration ponceau a été réalisée pour vérifier le transfert et contrôler la charge. Ensuite, la membrane a été saturée en tampon bloquant avec du lait 5 % dans du TBST (1 \times TBS avec 0,05 % Tween 20) pendant 1 heure et incubée 1 heure avec 16 ng/mL d'anti-biotine monoclonale de souris à fraction IgG conjuguée peroxydase (Jackson

Immunoresearch) après 3 lavages TBST, le signal a été détecté par réactif chimioluminescent (SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate, thermo-Scientific) et une caméra à chimioluminescence (Vilber Lourmat).

Pour évaluer la spécificité des sialyltransférases recombinantes Δ ST3GAL1 ou Δ ST6GAL1, le traitement de la fétuine resialylée par la PNGase F (Roche) a été effectué avant la chimie click et l'analyse Western Blot. Vingt μ g de glycoprotéines resialylées ont été incubées avec 50 mM de tampon phosphate dans un volume final de 21 μ L et bouillies à 100°C pendant 10 minutes. Après refroidissement, 1 unité de PNGase F a été ajoutée et incubée pendant 4 heures à 37°C. Après traitement, 9 volumes d'éthanol absolu ont été utilisés pour précipiter les protéines. L'étape de SDS-PAGE et Western-blot a ensuite été réalisé comme décrit précédemment.

VII. Sialylation exogène

Pour l'analyse en cytométrie en flux, les cellules CHO ont été cultivées dans du milieu DMEM contenant 10% de SVF dans des plaques de 24 puits jusqu'à atteindre 70% de confluence. Les cellules ont ensuite été incubées pendant 2 h à 37°C avec différentes concentrations en CMP-acide sialique (CMP-Neu5Ac ; CMP-SiaNAI ; CMP-SiaNAI clické) (0-50 μ M) et 200 μ L de milieu de culture issu des cellules transfectées contenant la sialyltransférase ou non (condition mock). Après lavage par du DPBS (Dulbecco Phosphate Buffer Saline), les cellules ont été détachées avec 5 mM d'EDTA et placées dans des plaques de 96 puits. Après centrifugation à 1200 RPM (Rotation par minute) pendant 5 min, les cellules sialylées avec le CMP-Neu5Ac ou le CMP-SiaNAI ont été incubées avec 1 μ g de *Sambucus Nigra* Agglutinin conjugué à la fluorescéine isothiocyanate (2mg/ mL, FITC-SNA lectin, Vector Laboratories) ont été incubées dans 50 μ L finaux de PBS/ BSA 1% avec les cellules pendant 1 h à 4°C. De la même façon, 1 μ g de *Maackia amurensis* lectin II conjugué à la biotine (1mg/ mL, MAL II, Vector Laboratories) ont été incubées avec les cellules dans 50 μ L de PBS/ BSA 1% durant 1 h à 4°C. Après 3 lavages au PBS, 0.1 μ g de streptavidine conjugué à la FITC (1mg/ mL, Dylight 488 streptavidin, Vector Laboratories) ont été ajoutés dans un volume finale de 50 μ L de PBS/ BSA 1% pendant 1 h à 4°C pour détecter la présence de biotine. Enfin, après 3 lavages de PBS, les cellules ont été transférées dans un tube de polystyrène à fond rond (BD Falcon) et la fluorescence a été quantifiée avec le cytomètre FACSCalibur (Becton Dickinson).

Pour la microscopie confocale, les cellules CHO-Lec2 ont été cultivées sur des lamelles de verre dans du DMEM-10% de SVF dans des puits de plaque 24 puits jusqu'à atteindre 70% de confluence. Après

des lavages au DPBS, les cellules ont été incubées avec 20 μ M de CMP-Neu5Ac ou CMP-SiaNAI durant 2 h. Les cellules ont ensuite été lavées, fixées avec du paraformaldéhyde 4% durant 20 min sur glace et incubées avec du PBS/ BSA 1% - saponine 0.075% durant 1 h à température. Par la suite, les cellules ont été incubées avec 1.33 μ g de lectines SNA-FITC dans 50 μ L de PBS/ BSA 1% durant 1 h à température ambiante. Les cellules ont ensuite été incubées avec du DAPI dilué au 1/200 dans du PBS pendant 20 min à température ambiante. Enfin, après 3 lavages au PBS, les lamelles de verre ont été montées sur lame grâce à du milieu de montage (Dako). La fluorescence a été détectée grâce à un microscope confocale Zeiss 700.

Références bibliographiques :

- Ali, S.R., Fong, J.J., Carlin, A.F., Busch, T.D., Linden, R., Angata, T., Areschoug, T., Parast, M., Varki, N., Murray, J., et al. (2014). Siglec-5 and Siglec-14 are polymorphic paired receptors that modulate neutrophil and amnion signaling responses to group B Streptococcus. *J. Exp. Med.* *211*, 1231–1242.
- Antony, P., Rose, M., Heidenreich, A., Knüchel, R., Gaisa, N.T., and Dahl, E. (2014). Epigenetic inactivation of ST6GAL1 in human bladder cancer. *BMC Cancer* *14*.
- Aquino-Gil, M., Pierce, A., Perez-Cervera, Y., Zenteno, E., and Lefebvre, T. (2017). OGT: a short overview of an enzyme standing out from usual glycosyltransferases. *Biochem. Soc. Trans.* *45*, 365–370.
- Ariga, T., McDonald, M.P., and Yu, R.K. (2008). Thematic Review Series: Sphingolipids. Role of ganglioside metabolism in the pathogenesis of Alzheimer's disease—a review. *J. Lipid Res.* *49*, 1157–1175.
- Axelsson, M.A.B., Karlsson, N.G., Steel, D.M., Ouwendijk, J., Nilsson, T., and Hansson, G.C. (2001). Neutralization of pH in the Golgi apparatus causes redistribution of glycosyltransferases and changes in the O-glycosylation of mucins. *Glycobiology* *11*, 633–644.
- Baenziger, J.U., and Fiete, D. (1979). Structure of the complex oligosaccharides of fetuin. *J. Biol. Chem.* *254*, 789–795.
- Barb, A.W., Brady, E.K., and Prestegard, J.H. (2009). Branch-Specific Sialylation of IgG-Fc Glycans by ST6Gal-I. *Biochemistry* *48*, 9705–9707.
- Bardor, M., Nguyen, D.H., Diaz, S., and Varki, A. (2005). Mechanism of Uptake and Incorporation of the Non-human Sialic Acid N-Glycolylneuraminic Acid into Human Cells. *J. Biol. Chem.* *280*, 4228–4237.
- Baskin, J.M., Prescher, J.A., Laughlin, S.T., Agard, N.J., Chang, P.V., Miller, I.A., Lo, A., Codelli, J.A., and Bertozzi, C.R. (2007). Copper-free click chemistry for dynamic in vivo imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *104*, 16793–16797.
- el-battari, assou, Jeanneau, C., Mathieu, S., Sigaud, R., PROROK-HAMON, M., and Ouafik, L. (2018). Elucidating the roles of Alzheimer disease-associated proteases and the signal-peptide peptidase-like 3 (SPPL3) in the shedding of glycosyltransferases.
- Baumann, A.-M.T., Bakkers, M.J.G., Buettner, F.F.R., Hartmann, M., Grove, M., Langereis, M.A., de Groot, R.J., and Mühlenhoff, M. (2015). 9-O-Acetylation of sialic acids is catalysed by CASD1 via a covalent acetyl-enzyme intermediate. *Nat. Commun.* *6*.
- BAUVOIS, B., CACAN, R., FOURNET, B., CAEN, J., MONTREUIL, J., and VERBERT, A. (1982). Discrimination between Activity of (α2—3)-Sialyltransferase and (α2—6)- Sialyltransferase in Human Platelets Using/7-Nitrophenyl-β-D-galactoside as Acceptor. *7*.
- Beck, W. (2009). Metal Complexes of Biologically Important Ligands, CLXXII [1]. Metal Ions and Metal Complexes as Protective Groups of Amino Acids and Peptides – Reactions at Coordinated Amino Acids. *Z. Für Naturforschung B* *64*, 1221–1245.

- Bentley, M., Liang, Y., Mullen, K., Xu, D., Sztul, E., and Hay, J.C. (2006). SNARE Status Regulates Tether Recruitment and Function in Homotypic COPII Vesicle Fusion. *J. Biol. Chem.* *281*, 38825–38833.
- Bernardo, A., Harrison, F.E., McCord, M., Zhao, J., Bruchey, A., Davies, S.S., Jackson Roberts, L., Mathews, P.M., Matsuoka, Y., Ariga, T., et al. (2009). Elimination of GD3 synthase improves memory and reduces amyloid- β plaque load in transgenic mice. *Neurobiol. Aging* *30*, 1777–1791.
- Bhide, G.P., Prehna, G., Ramirez, B.E., and Colley, K.J. (2017). The Polybasic Region of the Polysialyltransferase ST8Sia-IV Binds Directly to the Neural Cell Adhesion Molecule, NCAM. *Biochemistry* *56*, 1504–1517.
- Bieberich, E., Freischütz, B., Liour, S.-S., and Yu, R.K. (1998). Regulation of Ganglioside Metabolism by Phosphorylation and Dephosphorylation. *J. Neurochem.* *71*, 972–979.
- Bisswanger, H. (2014). Enzyme assays. *Perspect. Sci.* *1*, 41–55.
- Bobowski, M., Vincent, A., Steenackers, A., Colomb, F., Van Seuning, I., Julien, S., and Delannoy, P. (2013). Estradiol represses the G(D3) synthase gene ST8SIA1 expression in human breast cancer cells by preventing NF κ B binding to ST8SIA1 promoter. *PLoS One* *8*, e62559.
- Bork, K., Weidemann, W., Berneck, B., Kuchta, M., Bennmann, D., Thate, A., Huber, O., Gnanapragassam, V.S., and Horstkorte, R. (2017). The expression of sialyltransferases is regulated by the bioavailability and biosynthesis of sialic acids. *Gene Expr. Patterns* *23–24*, 52–58.
- Bourne, Y., and Henrissat, B. Glycoside hydrolases and glycosyltransferases: families and functional modules. *8*.
- Bretscher, M.S., and Munro, S. (1993). Cholesterol and the Golgi apparatus. *Science* *261*, 1280–1281.
- Burchell, J., Poulson, R., Hanby, A., Whitehouse, C., Cooper, L., Clausen, H., Miles, D., and Taylor-Papadimitriou, J. (1999). An α 2,3 sialyltransferase (ST3Gal I) is elevated in primary breast carcinomas. *Glycobiology* *9*, 1307–1311.
- Burger, P.C., Lötscher, M., Streiff, M., Kleene, R., Kaissling, B., and Berger, E.G. Immunocytochemical localization of α 2,3(N)-sialyltransferase (ST3Gal III) in cell lines and rat kidney tissue sections: evidence for Golgi and post-Golgi localization. *13*.
- Büttner, B., Kannicht, C., Schmidt, C., Löster, K., Reutter, W., Lee, H.-Y., Nöhring, S., and Horstkorte, R. (2002). Biochemical Engineering of Cell Surface Sialic Acids Stimulates Axonal Growth. *J. Neurosci.* *22*, 8869–8875.
- Cai, H., Zhou, H., Miao, Y., Li, N., Zhao, L., and Jia, L. (2017). MiRNA expression profiles reveal the involvement of miR-26a, miR-548l and miR-34a in hepatocellular carcinoma progression through regulation of ST3GAL5. *Lab. Invest.* *97*, 530–542.
- Capicciotti, C.J., Zong, C., Sheikh, M.O., Sun, T., Wells, L., and Boons, G.-J. (2017). Cell-Surface Glyco-Engineering by Exogenous Enzymatic Transfer Using a Bifunctional CMP-Neu5Ac Derivative. *J. Am. Chem. Soc.* *139*, 13342–13348.
- Cariappa, A., Takematsu, H., Liu, H., Diaz, S., Haider, K., Boboila, C., Kalloo, G., Connole, M., Shi, H.N., Varki, N., et al. (2009). B cell antigen receptor signal strength and peripheral B cell development are regulated by a 9- O -acetyl sialic acid esterase. *J. Exp. Med.* *206*, 125–138.

- Cazet, A., Lefebvre, J., Adriaenssens, E., Julien, S., Bobowski, M., Grigoriadis, A., Tutt, A., Tulasne, D., Bourhis, X.L., and 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.
- Cazet, A., Bobowski, M., Rombouts, Y., Lefebvre, J., Steenackers, A., Popa, I., Guérardel, Y., Le Bourhis, X., Tulasne, D., and Delannoy, P. (2012). The ganglioside GD2 induces the constitutive activation of c-Met in MDA-MB-231 breast cancer cells expressing the GD3 synthase. *Glycobiology* *22*, 806–816.
- Chang, L.-Y., Harduin-Lepers, A., Kitajima, K., Sato, C., Huang, C.-J., Khoo, K.-H., and Guérardel, Y. (2009). Developmental regulation of oligosialylation in zebrafish. *Glycoconj. J.* *26*, 247–261.
- Chen, C., and Colley, K.J. (2000). Minimal structural and glycosylation requirements for ST6Gal I activity and trafficking. *Glycobiology* *10*, 531–583.
- Chong, Y.K., Sandanaraj, E., Koh, L.W.H., Thangaveloo, M., Tan, M.S.Y., Koh, G.R.H., Toh, T.B., Lim, G.G.Y., Holbrook, J.D., Kon, O.L., et al. (2015). ST3GAL1-Associated Transcriptomic Program in Glioblastoma Tumor Growth, Invasion, and Prognosis. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* *108*.
- Chou, H.-H., Hayakawa, T., Diaz, S., Krings, M., Indriati, E., Leakey, M., Paabo, S., Satta, Y., Takahata, N., and Varki, A. (2002). Inactivation of CMP-N-acetylneuraminic acid hydroxylase occurred prior to brain expansion during human evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *99*, 11736–11741.
- Colley, K.J., and Paulson, J.C. (1989). Glycosyltransferases. Structure, localization, and control of cell type-specific glycosylation. *J. Biol. Chem.*
- Comelli, E.M., Head, S.R., Gilmartin, T., Whisenant, T., Haslam, S.M., North, S.J., Wong, N.-K., Kudo, T., Narimatsu, H., Esko, J.D., et al. (2006). A focused microarray approach to functional glycomics: transcriptional regulation of the glycome. *Glycobiology* *16*, 117–131.
- Corfield, A. (2015). Mucins: A biologically relevant glycan barrier in mucosal protection. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* *1850*, 236–252.
- Corfield, A., and Berry, M. (2015). Glycan variation and evolution in the eukaryotes. *Trends Biochem. Sci.* *40*, 351–359.
- Costa, M., Salnikow, K., Cosentino, S., Klein, C.B., Huang, X., and Zhuang, Z. (1994). Molecular mechanisms of nickel carcinogenesis. *Environ. Health Perspect.* *102*, 127–130.
- Crespo, P.M., Demichelis, V.T., and Daniotti, J.L. (2010). Neobiosynthesis of Glycosphingolipids by Plasma Membrane-associated Glycosyltransferases. *J. Biol. Chem.* *285*, 29179–29190.
- Crocker, P.R., Kelm, S., Dubois, C., Martin, B., McWilliam, A.S., Shotton, D.M., Paulson, J.C., and Gordon, S. (1991). Purification and properties of sialoadhesin, a sialic acid-binding receptor of murine tissue macrophages. *EMBO J.* *10*, 1661–1669.
- Crous, W., and Naidoo, K.J. (2016). Conformational and electrostatic analysis of SN1 donor analogue glycomimetic inhibitors of ST3Gal-I mammalian sialyltransferase. *Bioorg. Med. Chem.* *24*, 4998–5005.
- Crowe, K.E., Shao, G., Flanigan, K.M., and Martin, P.T. (2016). N-terminal α Dystroglycan (α DG-N): A Potential Serum Biomarker for Duchenne Muscular Dystrophy. *J. Neuromuscul. Dis.* *3*, 247–260.

- Daniotti, J.L., Pedro, M.P., and Valdez Taubas, J. (2017). The role of S-acylation in protein trafficking. *Traffic* 18, 699–710.
- Datta, A.K., and Paulson, J.C. (1995). The Sialyltransferase Sialylmotif Participates in Binding the Donor Substrate CMP-NeuAc. *J. Biol. Chem.* 270, 1497–1500.
- Datta, A.K., and Paulson, J.C. (1997). Sialylmotifs of sialyltransferases. *Indian J. Biochem. Biophys.* 34, 157–165.
- Datta, A.K., Sinha, A., and Paulson, J.C. (1998). Mutation of the Sialyltransferase S-sialylmotif Alters the Kinetics of the Donor and Acceptor Substrates. *J. Biol. Chem.* 273, 9608–9614.
- Datta, A.K., Chammas, R., and Paulson, J.C. (2001). Conserved Cysteines in the Sialyltransferase Sialylmotifs Form an Essential Disulfide Bond. *J. Biol. Chem.* 276, 15200–15207.
- Denkhaus, E., and Salnikow, K. (2002). Nickel essentiality, toxicity, and carcinogenicity. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 42, 35–56.
- Der Vartanian, A., Audfray, A., Al Jaam, B., Janot, M., Legardinier, S., Maftah, A., and Germot, A. (2015). Protein O-Fucosyltransferase 1 Expression Impacts Myogenic C2C12 Cell Commitment via the Notch Signaling Pathway. *Mol. Cell. Biol.* 35, 391–405.
- Dewald, J.H., Cavdarli, S., Steenackers, A., Delannoy, C.P., Mortuaire, M., Spriet, C., Noël, M., Groux-Degroote, S., and Delannoy, P. (2018). TNF differentially regulates ganglioside biosynthesis and expression in breast cancer cell lines. *PLoS One* 13, e0196369.
- van Diepen, L., Buettner, F.F.R., Hoffmann, D., Thiesler, C.T., von Bohlen und Halbach, O., von Bohlen und Halbach, V., Jensen, L.R., Steinemann, D., Edvardson, S., Elpeleg, O., et al. (2018). A patient-specific induced pluripotent stem cell model for West syndrome caused by ST3GAL3 deficiency. *Eur. J. Hum. Genet.*
- Donadio, S., Dubois, C., Fichant, G., Roybon, L., Guillemot, J.-C., Breton, C., and Ronin, C. (2003). Recognition of cell surface acceptors by two human α -2,6-sialyltransferases produced in CHO cells. *Biochimie* 85, 311–321.
- Dougher, C.W.L., Buffone, A., Nemeth, M.J., Nasirikenari, M., Irons, E.E., Bogner, P.N., and Lau, J.T.Y. (2017). The blood-borne sialyltransferase ST6Gal-1 is a negative systemic regulator of granulopoiesis. *J. Leukoc. Biol.* 102, 507–516.
- Dulary, E., Potelle, S., Legrand, D., and Foulquier, F. (2017). TMEM165 deficiencies in Congenital Disorders of Glycosylation type II (CDG-II): Clues and evidences for roles of the protein in Golgi functions and ion homeostasis. *Tissue Cell* 49, 150–156.
- Dumont, M., Lehner, A., Vauzeilles, B., Malassis, J., Marchant, A., Smyth, K., Linclau, B., Baron, A., Pons, J.M., Anderson, C.T., et al. (2016). Plant cell wall imaging by metabolic click-mediated labelling of rhamnogalacturonan II using azido 3-deoxy-d-manno-oct-2-ulosonic acid. *Plant J.* 85, 437–447.
- Eckert, E.S.P., Reckmann, I., Hellwig, A., Röhling, S., El-Battari, A., Wieland, F.T., and Popoff, V. (2014). Golgi phosphoprotein 3 triggers signal-mediated incorporation of glycosyltransferases into coatomer-coated (COPI) vesicles. *J. Biol. Chem.* 289, 31319–31329.

Edvardson, S., Baumann, A.-M., Mühlenhoff, M., Stephan, O., Kuss, A.W., Shaag, A., He, L., Zenvirt, S., Tanzi, R., Gerardy-Schahn, R., et al. (2013). West syndrome caused by *ST3Gal-III* deficiency: *ST3GAL3 Mutation Causes West Syndrome*. *Epilepsia* *54*, e24–e27.

Egrie, J.C., Dwyer, E., Browne, J.K., Hitz, A., and Lykos, M.A. (2003). Darbepoetin alfa has a longer circulating half-life and greater in vivo potency than recombinant human erythropoietin. *Exp. Hematol.* *31*, 290–299.

El-Battari, A. (2003). Different glycosyltransferases are differentially processed for secretion, dimerization, and autoglycosylation. *Glycobiology* *13*, 941–953.

Elbein, and Pan (1990). Pan Elbein 1990 Control of N-linked oligosaccharide synthesis cellular levels of dolichyl phosphate are not the only regulatory factor.pdf.

Erdmann, H., Steeg, C., Koch-Nolte, F., Fleischer, B., and Jacobs, T. (2009). Sialylated ligands on pathogenic *Trypanosoma cruzi* interact with Siglec-E (sialic acid-binding Ig-like lectin-E). *Cell. Microbiol.* *11*, 1600–1611.

Erikson, E., Wratil, P.R., Frank, M., Ambiel, I., Pahnke, K., Pino, M., Azadi, P., Izquierdo-Useros, N., Martinez-Picado, J., Meier, C., et al. (2015). Mouse Siglec-1 Mediates trans-Infection of Surface-bound Murine Leukemia Virus in a Sialic Acid N-Acyl Side Chain-dependent Manner. *J. Biol. Chem.* *290*, 27345–27359.

Fast, D.G. (1990). The role of the carbohydrate chains of Ga1 β 1-4 G1cNAc α 2-6 sialyltransferase for enzyme activity.

Fenteany, F.H., and Colley, K.J. (2005). Multiple Signals Are Required for α 2,6-Sialyltransferase (ST6Gal I) Oligomerization and Golgi Localization. *J. Biol. Chem.* *280*, 5423–5429.

Fernandes, A.I., and Gregoriadis, G. (2001). The effect of polysialylation on the immunogenicity and antigenicity of asparaginase: implication in its pharmacokinetics. *Int. J. Pharm.* *217*, 215–224.

Fisher, P., and Ungar, D. (2016). Bridging the Gap between Glycosylation and Vesicle Traffic. *Front. Cell Dev. Biol.* *4*.

Foulquier, F., Vasile, E., Schollen, E., Callewaert, N., Raemaekers, T., Quelhas, D., Jaeken, J., Mills, P., Winchester, B., Krieger, M., et al. (2006). Conserved oligomeric Golgi complex subunit 1 deficiency reveals a previously uncharacterized congenital disorder of glycosylation type II. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 3764–3769.

Foulquier, F., Amyere, M., Jaeken, J., Zeevaert, R., Schollen, E., Race, V., Bammens, R., Morelle, W., Rosnoblet, C., Legrand, D., et al. (2012). TMEM165 Deficiency Causes a Congenital Disorder of Glycosylation. *Am. J. Hum. Genet.* *91*, 15–26.

Freeze, H.H., Hart, G.W., and Schnaar, R.L. (2015). Glycosylation Precursors. In *Essentials of Glycobiology*, A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko, P. Stanley, G.W. Hart, M. Aebi, A.G. Darvill, T. Kinoshita, N.H. Packer, J.H. Prestegard, et al., eds. (Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press), p.

Fuchs, T.A., Abed, U., Goosmann, C., Hurwitz, R., Schulze, I., Wahn, V., Weinrauch, Y., Brinkmann, V., and Zychlinsky, A. (2007). Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.* *176*, 231–241.

Fujitani, N., Furukawa, J., Araki, K., Fujioka, T., Takegawa, Y., Piao, J., Nishioka, T., Tamura, T., Nikaido, T., Ito, M., et al. (2013). Total cellular glycomics allows characterizing cells and streamlining the discovery process for cellular biomarkers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 2105–2110.

Funderburgh, J.L. (2002). Keratan Sulfate Biosynthesis. *IUBMB Life* *54*, 187–194.

Geisler, C., and 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*, 988–993.

Geremia, R.A., Harduin-Lepers, A., and Delannoy, P. (1997). Letters to the Glyco-Forum Identification of two novel conserved amino acid residues in eukaryotic sialyltransferases: implications for their mechanism of action. *Glycobiology* *7*, 161–161.

Gilormini, P.A., Lion, C., Vicogne, D., Levade, T., Potelle, S., Mariller, C., Guérardel, Y., Biot, C., and Foulquier, F. (2016a). A sequential bioorthogonal dual strategy: ManNAI and SiaNAI as distinct tools to unravel sialic acid metabolic pathways. *Chem. Commun.* *52*, 2318–2321.

Gilormini, P.-A., Lion, C., Noel, M., Krzewinski-Recchi, M.-A., Harduin-Lepers, A., Guérardel, Y., and Biot, C. (2016b). Improved workflow for the efficient preparation of ready to use CMP-activated sialic acids. *Glycobiology*.

Gilormini, P.-A., Batt, A.R., Pratt, M.R., and Biot, C. (2018). Asking more from metabolic oligosaccharide engineering. *Chem. Sci.*

Glüer, S., Schelp, C., Madry, N., von Schweinitz, D., Eckhardt, M., and Gerardy-Schahn, R. (1998). Serum polysialylated neural cell adhesion molecule in childhood neuroblastoma. *Br. J. Cancer* *78*, 106–110.

Gordon-Lipkin, E., Cohen, J.S., Srivastava, S., Soares, B.P., Levey, E., and Fatemi, A. (2018). ST3GAL5-Related Disorders: A Deficiency in Ganglioside Metabolism and a Genetic Cause of Intellectual Disability and Choreoathetosis. *J. Child Neurol.* 088307381879109.

Gregoriadis, G., McCormack, B., Wang, Z., and Lifely, R. (1993). Polysialic acids: potential in drug delivery. *FEBS Lett.* *315*, 271–276.

Groux-Degroote, S., Krzewinski-Recchi, M.-A., Cazet, A., Vincent, A., Lehoux, S., Lafitte, J.-J., van Seuning, I., and Delannoy, P. (2008). 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.

Groux-Degroote, S., Wavelet, C., Krzewinski-Recchi, M.-A., Portier, L., Mortuaire, M., Mihalache, A., Trinchera, M., Delannoy, P., Malagolini, N., Chiricolo, M., et al. (2014). B4GALNT2 gene expression controls the biosynthesis of Sda and sialyl Lewis X antigens in healthy and cancer human gastrointestinal tract. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *53*, 442–449.

Groux-Degroote, S., Schulz, C., Cogez, V., Noël, M., Portier, L., Vicogne, D., Solorzano, C., Dall'Olio, F., Steenackers, A., Mortuaire, M., et al. (2018). The extended cytoplasmic tail of the human B4GALNT2 is critical for its Golgi targeting and post-Golgi sorting. *FEBS J. O.*

Gu, X., Preuß, U., Gu, T., and Yu, R.K. (2002). Regulation of Sialyltransferase Activities by Phosphorylation and Dephosphorylation. *J. Neurochem.* *64*, 2295–2302.

- Guérardel, Y., Chang, L.-Y., Maes, E., Huang, C.-J., and Khoo, K.-H. (2006). Glycomic survey mapping of zebrafish identifies unique sialylation pattern. *Glycobiology* 16, 244–257.
- Gulberti, S., Lattard, V., Fondeur, M., Jacquinet, J.-C., Mulliert, G., Netter, P., Magdalou, J., Ouzzine, M., and Fournel-Gigleux, S. (2005). Modifications of the Glycosaminoglycan-Linkage Region of Proteoglycans: Phosphorylation and Sulfation Determine the Activity of the Human β 1,4-Galactosyltransferase 7 and β 1,3-Glucuronosyltransferase I. *Sci. World J.* 5, 510–514.
- Gupta, R., Matta, K.L., and Neelamegham, S. (2016). A systematic analysis of acceptor specificity and reaction kinetics of five human α (2,3)sialyltransferases: Product inhibition studies illustrate reaction mechanism for ST3Gal-I. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 469, 606–612.
- Hakomori, S. (1989). Aberrant Glycosylation In Tumors And Tumor-Associated Carbohydrate Antigens. In *Advances in Cancer Research*, (Elsevier), pp. 257–331.
- Han, X., Si, L.-L., Shi, Y.-Y., Fan, Z.-B., Wang, S.-X., Tian, Z.-Y., Li, M., Sun, J.-Q., Jiao, P.-X., Ran, F.-X., et al. (2017). Synthesis and In Vitro Anti-Influenza Virus Evaluation of Novel Sialic Acid (C-5 and C-9)-Pentacyclic Triterpene Derivatives. *Molecules* 22, 1018.
- Han, Y., Liu, Y., Fu, X., Zhang, Q., Huang, H., Zhang, C., Li, W., and Zhang, J. (2018). miR-9 inhibits the metastatic ability of hepatocellular carcinoma via targeting beta galactoside alpha-2,6-sialyltransferase 1. *J. Physiol. Biochem.* 74, 491–501.
- Harduin-Lepers, A. (2013). Vertebrate sialyltransferases. *Sialobiology Struct. Biosynth. Funct. Sialic Acid Glycoconj. Health Dis.* Bentham Sci. 139–187.
- Harduin-Lepers, A., Stokes, D.C., Steelant, W.F., Samyn-Petit, B., Krzewinski-Recchi, M.A., Vallejo-Ruiz, V., Zanetta, J.P., Augé, C., and Delannoy, P. (2000). Cloning, expression and gene organization of a human Neu5Ac alpha 2-3Gal beta 1-3GalNAc alpha 2,6-sialyltransferase: hST6GalNAcIV. *Biochem. J.* 352, 37–48.
- Harduin-Lepers, A., Mollicone, R., Delannoy, P., and Oriol, R. (2005). The animal sialyltransferases and sialyltransferase-related genes: a phylogenetic approach. *Glycobiology* 15, 805–817.
- Harduin-Lepers, A., Petit, D., Mollicone, R., Delannoy, P., Petit, J.-M., and Oriol, R. (2008). Evolutionary history of the alpha2,8-sialyltransferase (ST8Sia) gene family: Tandem duplications in early deuterostomes explain most of the diversity found in the vertebrate ST8Sia genes. *BMC Evol. Biol.* 8, 258.
- Harrus, D., Kellokumpu, S., and Glumoff, T. (2018). Crystal structures of eukaryote glycosyltransferases reveal biologically relevant enzyme homooligomers. *Cell. Mol. Life Sci.* 75, 833–848.
- Hassinen, A., Rivinoja, A., Kauppila, A., and Kellokumpu, S. (2010). Golgi N -Glycosyltransferases Form Both Homo- and Heterodimeric Enzyme Complexes in Live Cells. *J. Biol. Chem.* 285, 17771–17777.
- Helenius, J., Ng, D.T.W., Marolda, C.L., Walter, P., Valvano, M.A., and Aebi, M. (2002). Translocation of lipid-linked oligosaccharides across the ER membrane requires Rft1 protein. *Cell.* 110, 415, 6.
- Hellec, C., Delos, M., Carpentier, M., Denys, A., and Allain, F. (2018). The heparan sulfate 3-O-sulfotransferases (HS3ST) 2, 3B and 4 enhance proliferation and survival in breast cancer MDA-MB-231 cells. *PLoS One* 13, e0194676.

Higai, K., Ishihara, S., and Matsumoto, K. (2006). NF κ B-p65 dependent transcriptional regulation of glycosyltransferases in human colon adenocarcinoma HT-29 by stimulation with tumor necrosis factor alpha. *Biol. Pharm. Bull.* *29*, 2372–2377.

Horstkorte, R., Rau, K., Laabs, S., Danker, K., and Reutter, W. (2004a). Biochemical engineering of the N -acyl side chain of sialic acid leads to increased calcium influx from intracellular compartments and promotes differentiation of HL60 cells. *FEBS Lett.* *571*, 99–102.

Horstkorte, R., Mühlhoff, M., Reutter, W., Nöhling, S., Zimmermann-Kordmann, M., and Gerardy-Schahn, R. (2004b). Selective inhibition of polysialyltransferase ST8SialII by unnatural sialic acids. *Exp. Cell Res.* *298*, 268–274.

Houdou, M., Lebredonchel, E., Garat, A., Duvet, S., Legrand, D., Decool, V., Klein, A., Ouzzine, M., Gasnier, B., Potelle, S., et al. (2018). Involvement of thapsigargin and cyclopiazonic acid-sensitive pumps in the rescue of TMEM165-associated glycosylation defects by Mn²⁺. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* fj201800387R.

Imre, T., Kremmer, T., Héberger, K., Molnár-Szöllősi, É., Ludányi, K., Pócsfalvi, G., Malorni, A., Drahos, L., and Vékey, K. (2008). Mass spectrometric and linear discriminant analysis of N-glycans of human serum alpha-1-acid glycoprotein in cancer patients and healthy individuals. *J. Proteomics* *71*, 186–197.

Inoue, S., and Kitajima, K. (2006). KDN (Deaminated neuraminic acid): Dreamful past and exciting future of the newest member of the sialic acid family. *Glycoconj. J.* *23*, 277–290.

Inoue, S., Lin, S.-L., Chang, T., Wu, S.-H., Yao, C.-W., Chu, T.-Y., Troy, F.A., and Inoue, Y. (1998). Identification of Free Deaminated Sialic Acid (2-Keto-3-deoxy-d-glycero-d-galacto-nononic Acid) in Human Red Blood Cells and Its Elevated Expression in Fetal Cord Red Blood Cells and Ovarian Cancer Cells. *J. Biol. Chem.* *273*, 27199–27204.

Jaeken, J., Hennet, T., Matthijs, G., and Freeze, H.H. (2009). CDG nomenclature: Time for a change! *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* *1792*, 825–826.

Jeanneau, C., Chazalet, V., Augé, C., Soumpasis, D.M., Harduin-Lepers, A., Delannoy, P., Imberty, A., and Breton, C. (2004). Structure-Function Analysis of the Human Sialyltransferase ST3Gal I: ROLE OF N- GLYCOSYLATION AND A NOVEL CONSERVED SIALYLMOTIF. *J. Biol. Chem.* *279*, 13461–13468.

Jia, M., Mu, W., Chu, F., Zhang, X., Jiang, B., Zhou, L.L., and Zhang, T. (2014). A d-psicose 3-epimerase with neutral pH optimum from *Clostridium boltea* for d-psicose production: cloning, expression, purification, and characterization. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *98*, 717–725.

Joziase, D.H., Schiphorst, W.E., Eijnden, D.H.V. den, Kuik, J.A.V., Halbeek, H.V., and Vliegthart, J.F. (1987). Branch specificity of bovine colostrum CMP-sialic acid: Gal beta 1----4GlcNAc-R alpha 2----6-sialyltransferase. Sialylation of bi-, tri-, and tetraantennary oligosaccharides and glycopeptides of the N-acetylactosamine type. *J. Biol. Chem.* *262*, 2025–2033.

Katorcha, E., and Baskakov, I.V. (2017). Analyses of N-linked glycans of PrP^{Sc} revealed predominantly 2,6-linked sialic acid residues. *FEBS J.* *284*, 3727–3738.

Katorcha, E., Makarava, N., Savtchenko, R., d'Azzo, A., and Baskakov, I.V. (2014). Sialylation of Prion Protein Controls the Rate of Prion Amplification, the Cross-Species Barrier, the Ratio of PrP^{Sc} Glycoform and Prion Infectivity. *PLoS Pathog.* *10*, e1004366.

- Kawamura, Y.I., Toyota, M., Kawashima, R., Hagiwara, T., Suzuki, H., Imai, K., Shinomura, Y., Tokino, T., Kannagi, R., and Dohi, T. (2008). DNA Hypermethylation Contributes to Incomplete Synthesis of Carbohydrate Determinants in Gastrointestinal Cancer. *Gastroenterology* 135, 142-151.e3.
- Kawar, Z.S., Haslam, S.M., Morris, H.R., Dell, A., and Cummings, R.D. (2005). Novel Poly-GalNAc β 1-4GlcNAc (LacdiNAc) and Fucosylated Poly-LacdiNAc N-Glycans from Mammalian Cells Expressing β 1,4-N-Acetylgalactosaminyltransferase and α 1,3-Fucosyltransferase. *J. Biol. Chem.* 280, 12810–12819.
- Kean, E.L. (1991). Sialic acid activation. *Glycobiology* 1, 441–447.
- Kean, E.L., and Bighouse, K.J. (1974). Cytidine 5'-Monophosphosialic Acid Hydrolase SUBCELLULAR LOCATION AND PROPERTIES. *J. Biol. Chem.* 249, 7813–7823.
- Keppler, O.T., Stehling, P., Herrmann, M., Kayser, H., Grunow, D., Reutter, W., and Pawlita, M. (1995). Biosynthetic Modulation of Sialic Acid-dependent Virus-Receptor Interactions of Two Primate Polyoma Viruses. *J. Biol. Chem.* 270, 1308–1314.
- Khan, A., Sergi, C., Khan, A., and Sergi, C. (2018). Sialidosis: A Review of Morphology and Molecular Biology of a Rare Pediatric Disorder. *Diagnostics* 8, 29.
- Kitazume, S., Tachida, Y., Oka, R., Shirotani, K., Saido, T.C., and Hashimoto, Y. (2001). Alzheimer's β -secretase, β -site amyloid precursor protein-cleaving enzyme, is responsible for cleavage secretion of a Golgi-resident sialyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 13554–13559.
- Kitazume, S., Tachida, Y., Oka, R., Nakagawa, K., Takashima, S., Lee, Y.-C., and Hashimoto, Y. (2006). Screening a series of sialyltransferases for possible BACE1 substrates. *Glycoconj. J.* 23, 437–441.
- Klohs, W.D., Bernacki, R.J., and Korytnyk, W. (1979). Effects of Nucleotides and Nucleotide:Analogues on Human Serum Sialyltransferase. *Cancer Res.* 39, 1231–1238.
- Koles, K., Irvine, K.D., and Panin, V.M. (2004). Functional Characterization of Drosophila Sialyltransferase. *J. Biol. Chem.* 279, 4346–4357.
- Kolter, T., and Sandhoff, K. (1997). Sialic acids—why always α -linked? *Glycobiology* 7, 873–873.
- Kono, M., Ohya, Y., Lee, Y.-C., Hamamoto, T., Kojima, N., and Tsuji, S. (2018). Mouse p-galactoside α 2,3-sialyltransferases: comparison of in vitro substrate specificities and tissue specific expression. 11.
- Koulaxouzidis, G., Reutter, W., Hildebrandt, H., Stark, G.B., and Witzel, C. (2015). In vivo stimulation of early peripheral axon regeneration by N-propionylmannosamine in the presence of polysialyltransferase ST8SIA2. *J. Neural Transm.* 122, 1211–1219.
- Krzewinski-Recchi, M.-A., Julien, S., Juliant, S., Teinturier-Lelièvre, M., Samyn-Petit, B., Montiel, M.-D., Mir, A.-M., Cerutti, M., Harduin-Lepers, A., and Delannoy, P. (2003). Identification and functional expression of a second human β -galactoside α 2,6-sialyltransferase, ST6Gal II: Characterization of the human ST6Gal II. *Eur. J. Biochem.* 270, 950–961.
- Kuhn, B., Benz, J., Greif, M., Engel, A.M., Sobek, H., and Rudolph, M.G. (2013). The structure of human α -2,6-sialyltransferase reveals the binding mode of complex glycans. *Acta Crystallogr. Sect. D* 69, 1826–1838.

- Kumar, R., Nasi, R., Bhasin, M., Huan Khieu, N., Hsieh, M., Gilbert, M., Jarrell, H., Zou, W., and Jennings, H.J. (2013). Sialyltransferase inhibitors: consideration of molecular shape and charge/hydrophobic interactions. *Carbohydr. Res.* *378*, 45–55.
- Kurosawa, N., Takashima, S., Kono, M., Ikehara, Y., Inoue, M., Tachida, Y., Narimatsu, H., and Tsuji, S. (2000). Molecular Cloning and Genomic Analysis of Mouse GalNAc α 2,6- Sialyltransferase (ST6GalNAc I). *J. Biol. Chem.* *275*, 11.
- Lammers, G., and Jamieson, J.C. (1986). Studies on the effect of experimental inflammation on sialyltransferase in the mouse and guinea pig. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Comp. Biochem.* *84*, 181–187.
- Larsson, O. (1988). The role of HMG CoA reductase and dolichol synthesis in the control of 3T6 cell proliferation: effects of cell crowding, serum depletion and addition of epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.* *263*, 8.
- Lauc, G., Vojta, A., and Zoldoš, V. (2014). Epigenetic regulation of glycosylation is the quantum mechanics of biology. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* *1840*, 65–70.
- Laughlin, S.T., Baskin, J.M., Amacher, S.L., and Bertozzi, C.R. (2008). In Vivo Imaging of Membrane-Associated Glycans in Developing Zebrafish. *Science* *320*, 664–667.
- Lee, H.J., Lairson, L.L., Rich, J.R., Lameignere, E., Wakarchuk, W.W., Withers, S.G., and Strynadka, N.C.J. (2011). Structural and Kinetic Analysis of Substrate Binding to the Sialyltransferase Cst-II from *Campylobacter jejuni*. *J. Biol. Chem.* *286*, 35922–35932.
- Lee, M.M., Nasirikenari, M., Manhardt, C.T., Ashline, D.J., Hanneman, A.J., Reinhold, V.N., and Lau, J.T.Y. (2014). Platelets Support Extracellular Sialylation by Supplying the Sugar Donor Substrate. *J. Biol. Chem.* *289*, 8742–8748.
- Legaigneur, P., Breton, C., Battari, A.E., Guillemot, J.-C., Augé, C., Malissard, M., Berger, E.G., and Ronin, C. (2001). Exploring the Acceptor Substrate Recognition of the Human β -Galactoside α 2,6- Sialyltransferase. *J. Biol. Chem.* *276*, 21608–21617.
- Lehoux, S., Groux-Degroote, S., Cazet, A., Dhaenens, C.-M., Maurage, C.-A., Caillet-Boudin, M.-L., Delannoy, P., and Krzewinski-Recchi, M.-A. (2010). Transcriptional regulation of the human ST6GAL2 gene in cerebral cortex and neuronal cells. *Glycoconj. J.* *27*, 99–114.
- Leòn, J. de, Fernández, A., Mesa, C., Clavel, M., and Fernández, L.E. (2006). Role of tumour-associated *N*-glycosylated variant of GM3 ganglioside in cancer progression: effect over CD4 expression on T cells. *Cancer Immunol. Immunother.* *55*, 443–450.
- Li, Y., Luo, S., Dong, W., Song, X., Zhou, H., Zhao, L., and Jia, L. (2016). Alpha-2, 3-sialyltransferases regulate the multidrug resistance of chronic myeloid leukemia through miR-4701-5p targeting ST3GAL1. *Lab. Invest.* *96*, 731–740.
- Lightfoot, N.E., Berriault, C.J., Seilkop, S.K., and Conard, B.R. (2017). Nonrespiratory mortality and cancer incidence in a cohort of Canadian nickel workers. *Arch. Environ. Occup. Health* *72*, 187–203.
- Liu, S., and Storrie, B. (2012). Are Rab Proteins the Link Between Golgi Organization and Membrane Trafficking? *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *69*, 4093–4106.
- Liu, S., and Storrie, B. (2015). How Do Rab Proteins Determine Golgi Structure? *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* *315*, 1–22.

- Liu, B., Liu, Y., Zhao, L., Pan, Y., Shan, Y., Li, Y., and Jia, L. (2017). Upregulation of microRNA-135b and microRNA-182 promotes chemoresistance of colorectal cancer by targeting ST6GALNAC2 via PI3K/AKT pathway. *Mol. Carcinog.* *56*, 2669–2680.
- Liu, Y.-C., Yen, H.-Y., Chen, C.-Y., Chen, C.-H., Cheng, P.-F., Juan, Y.-H., Chen, C.-H., Khoo, K.-H., Yu, C.-J., Yang, P.-C., et al. (2011). Sialylation and fucosylation of epidermal growth factor receptor suppress its dimerization and activation in lung cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 11332–11337.
- Livingston, B.D., and Paulson, J.C. (1993). Polymerase chain reaction cloning of a developmentally regulated member of the sialyltransferase gene family. *J. Biol. Chem.* *268*, 11504–11507.
- Luley-Goedl, C., Schmoelzer, K., Thomann, M., Malik, S., Greif, M., Ribitsch, D., Jung, C., Sobek, H., Engel, A., Mueller, R., et al. (2016). Two N-terminally truncated variants of human β -galactoside α 2,6 sialyltransferase I with distinct properties for in vitro protein glycosylation. *Glycobiology* *26*, 1097–1106.
- Ma, X., Dong, W., Su, Z., Zhao, L., Miao, Y., Li, N., Zhou, H., and Jia, L. (2016). Functional roles of sialylation in breast cancer progression through miR-26a/26b targeting ST8SIA4. *Cell Death Dis.* *7*, e2561.
- Macauley, M.S., Arlian, B.M., Rillahan, C.D., Pang, P.-C., Bortell, N., Marcondes, M.C.G., Haslam, S.M., Dell, A., and Paulson, J.C. (2014). Systemic Blockade of Sialylation in Mice with a Global Inhibitor of Sialyltransferases. *J. Biol. Chem.* *289*, 35149–35158.
- Machamer, C.E. (1991). Golgi retention signals: do membranes hold the key? *Trends Cell Biol.* *1*, 141–144.
- Mahajan, V.S., and Pillai, S. (2016). SIALIC ACIDS AND AUTOIMMUNE DISEASE. *Immunol. Rev.* *269*, 145–161.
- Malsam, J., and Söllner, T.H. (2011). Organization of SNAREs within the Golgi Stack. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *3*.
- Mbua, N.E., Li, X., Flanagan-Steet, H.R., Meng, L., Aoki, K., Moremen, K.W., Wolfert, M.A., Steet, R., and Boons, G.-J. (2013). Selective Exo-Enzymatic Labeling (SEEL) of N-Glycans of Living Cells by Recombinant ST6Gal I. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* *52*.
- Meng, L., Forouhar, F., Thieker, D., Gao, Z., Ramiah, A., Moniz, H., Xiang, Y., Seetharaman, J., Milaninia, S., Su, M., et al. (2013). Enzymatic Basis for N-Glycan Sialylation. *J. Biol. Chem.* *288*, 34680–34698.
- Mercier, D., Wierinckx, A., Oulmouden, A., Gallet, P.F., Palcic, M.M., Harduin-Lepers, A., Delannoy, P., Petit, J.-M., Levéziel, H., and Julien, R. (1999). Molecular cloning, expression and exon/intron organization of the bovine β -galactoside α 2,6-sialyltransferase gene. *Glycobiology* *9*, 851–863.
- Miao, X., Jia, L., Zhou, H., Song, X., Zhou, M., Xu, J., Zhao, L., Feng, X., and Zhao, Y. (2016). miR-4299 mediates the invasive properties and tumorigenicity of human follicular thyroid carcinoma by targeting ST6GALNAC4: miR-4299 MEDIATES. *IUBMB Life* *68*, 136–144.
- Miyagi, T., and Yamaguchi, K. (2012). Mammalian sialidases: Physiological and pathological roles in cellular functions. *Glycobiology* *22*, 880–896.

- Moreau, H., Verhelst, B., Couloux, A., Derelle, E., Rombauts, S., Grimsley, N., Van Bel, M., Poulain, J., Katinka, M., Hohmann-Marriott, M.F., et al. (2012). Gene functionalities and genome structure in *Bathycoccus prasinus* reflect cellular specializations at the base of the green lineage. *Genome Biol.* *13*, R74.
- Moremen, K.W., and Robbins, P.W. (1991). Isolation, characterization, and expression of cDNAs encoding murine alpha-mannosidase II, a Golgi enzyme that controls conversion of high mannose to complex N-glycans. *J. Cell Biol.* *115*, 1521–1534.
- Moremen, K.W., Ramiah, A., Stuart, M., Steel, J., Meng, L., Forouhar, F., Moniz, H.A., Gahlay, G., Gao, Z., Chapla, D., et al. (2018). Expression system for structural and functional studies of human glycosylation enzymes. *Nat. Chem. Biol.* *14*, 156–162.
- Morgan, B.L., and Winick, M. (1980). Effects of environmental stimulation on brain N-acetylneuraminic acid content and behavior. *J. Nutr.* *110*, 425–432.
- Mortensen, E.L., Michaelsen, K.F., Sanders, S.A., and Reinisch, J.M. (2002). The Association Between Duration of Breastfeeding and Adult Intelligence. *JAMA* *287*, 2365–2371.
- Mukherjee, S., Zheng, H., Derebe, M.G., Callenberg, K.M., Partch, C.L., Rollins, D., Propheter, D.C., Rizo, J., Grabe, M., Jiang, Q.-X., et al. (2014). Antibacterial membrane attack by a pore-forming intestinal C-type lectin. *Nature* *505*, 103–107.
- Nairn, A.V., York, W.S., Harris, K., Hall, E.M., Pierce, J.M., and Moremen, K.W. (2008). Regulation of Glycan Structures in Animal Tissues. *J. Biol. Chem.* *283*, 17298–17313.
- Neres, J., Bryce, R.A., and Douglas, K.T. (2008). Rational drug design in parasitology: trans-sialidase as a case study for Chagas disease. *Drug Discov. Today* *13*, 110–117.
- Nidetzky, B., Gutmann, A., and Zhong, C. (2018). Leloir Glycosyltransferases as Biocatalysts for Chemical Production. *ACS Catal.* *8*, 6283–6300.
- Nilsson, T., Slusarewicz, P., Hoe, M.H., and Warren, G. (1993). Kin recognition: A model for the retention of Golgi enzymes. *FEBS Lett.* *330*, 1–4.
- Noel, M., Gilormini, P., Cogez, V., Yamakawa, N., Vicogne, D., Lion, C., Biot, C., Guérardel, Y., and Harduin-Lepers, A. (2017). Probing the CMP-Sialic Acid Donor Specificity of Two Human β -d-Galactoside Sialyltransferases (ST3Gal I and ST6Gal I) Selectively Acting on O- and N-Glycosylproteins. *Chembiochem* *18*, 1251–1259.
- Noel, M., Gilormini, P.-A., Cogez, V., Lion, C., Biot, C., Harduin-Lepers, A., and Guerardel, Y. (2018). MicroPlate Sialyltransferase Assay (MPSA): a rapid and sensitive assay based on an unnatural sialic acid donor and bioorthogonal chemistry. *Bioconjug. Chem.*
- North, S.J., Huang, H.-H., Sundaram, S., Jang-Lee, J., Etienne, A.T., Trollope, A., Chalabi, S., Dell, A., Stanley, P., and Haslam, S.M. (2010). Glycomics Profiling of Chinese Hamster Ovary Cell Glycosylation Mutants Reveals N-Glycans of a Novel Size and Complexity. *J. Biol. Chem.* *285*, 5759–5775.
- Padler-Karavani, V., Yu, H., Cao, H., Chokhawala, H., Karp, F., Varki, N., Chen, X., and Varki, A. (2008). Diversity in specificity, abundance, and composition of anti-Neu5Gc antibodies in normal humans: Potential implications for disease. *Glycobiology* *18*, 818–830.

- Padler-Karavani, V., Hurtado-Ziola, N., Chang, Y.-C., Sonnenburg, J.L., Ronaghy, A., Yu, H., Verhagen, A., Nizet, V., Chen, X., Varki, N., et al. (2013). Rapid evolution of binding specificities and expression patterns of inhibitory CD33-related Siglecs in primates. *FASEB J.* *28*, 1280–1293.
- Padra, M., Adamczyk, B., Benktander, J., Flahou, B., Skoog, E.C., Padra, J.T., Smet, A., Jin, C., Ducatelle, R., Samuelsson, T., et al. (2018). Helicobacter suis binding to carbohydrates on human and porcine gastric mucins and glycolipids occurs via two modes. *Virulence* *9*, 898–918.
- Park, J.-J., Yi, J.Y., Jin, Y.B., Lee, Y.-J., Lee, J.-S., Lee, Y.-S., Ko, Y.-G., and Lee, M. (2012). Sialylation of epidermal growth factor receptor regulates receptor activity and chemosensitivity to gefitinib in colon cancer cells. *Biochem. Pharmacol.* *83*, 849–857.
- Park, S.-Y., Yang, J.-S., Schmider, A.B., Soberman, R.J., and Hsu, V.W. (2015). Coordinated regulation of bidirectional COPI transport at the Golgi by CDC42. *Nature* *521*, 529–532.
- Patel, R.Y., and Balaji, P.V. (2006). Identification of linkage-specific sequence motifs in sialyltransferases. *Glycobiology* *16*, 108–116.
- Peanne, R., Legrand, D., Duvet, S., Mir, A.-M., Matthijs, G., Rohrer, J., and Foulquier, F. (2011). Differential effects of lobe A and lobe B of the Conserved Oligomeric Golgi complex on the stability of β 1,4-galactosyltransferase 1 and α 2,6-sialyltransferase 1. *Glycobiology* *21*, 864–876.
- Peixoto, A., Fernandes, E., Gaiteiro, C., Lima, L., Azevedo, R., Soares, J., Cotton, S., Parreira, B., Neves, M., Amaro, T., et al. (2016). Hypoxia enhances the malignant nature of bladder cancer cells and concomitantly antagonizes protein O-glycosylation extension. *Oncotarget* *7*, 63138–63157.
- Perdicchio, M., Ilarregui, J.M., Verstege, M.I., Cornelissen, L.A.M., Schetters, S.T.T., Engels, S., Ambrosini, M., Kalay, H., Veninga, H., Haan, J.M.M. den, et al. (2016). Sialic acid-modified antigens impose tolerance via inhibition of T-cell proliferation and de novo induction of regulatory T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *113*, 3329–3334.
- Petit, D., Mir, A.-M., Petit, J.-M., Thisse, C., Delannoy, P., Oriol, R., Thisse, B., and Harduin-Lepers, A. (2010). Molecular Phylogeny and Functional Genomics of β -Galactoside α 2,6-Sialyltransferases That Explain Ubiquitous Expression of *st6gal1* Gene in Amniotes. *J. Biol. Chem.* *285*, 38399–38414.
- Petit, D., Teppa, E., Mir, A.-M., Vicogne, D., Thisse, C., Thisse, B., Filloux, C., and Harduin-Lepers, A. (2015). Integrative View of α 2,3-Sialyltransferases (ST3Gal) Molecular and Functional Evolution in Deuterostomes: Significance of Lineage-Specific Losses. *Mol. Biol. Evol.* *32*, 906–927.
- Petit, D., Teppa, E., Cenci, U., Ball, S., and Harduin-Lepers, A. (2018). Reconstruction of the sialylation pathway in the ancestor of eukaryotes. *Sci. Rep.* *8*, 2946.
- Pokrovskaya, I.D., Willett, R., Smith, R.D., Morelle, W., Kudlyk, T., and Lupashin, V.V. (2011). Conserved oligomeric Golgi complex specifically regulates the maintenance of Golgi glycosylation machinery. *Glycobiology* *21*, 1554–1569.
- Powell, L.D., and Varki, A. (1994). The oligosaccharide binding specificities of CD22 beta, a sialic acid-specific lectin of B cells. *J. Biol. Chem.* *269*, 10628–10636.
- Prabhu, A., Gadre, R., and Gadgil, M. (2018). Zinc supplementation decreases galactosylation of recombinant IgG in CHO cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *102*, 5989–5999.

- Prescher, J.A., Dube, D.H., and Bertozzi, C.R. (2004). Chemical remodelling of cell surfaces in living animals. *Nature* *430*, 873–877.
- Prokazova, N.V., and Bergelson, L.D. Gangliosides and atherosclerosis. *Lipids* *29*, 1–5.
- Qian, R., Chen, C., and Colley, K.J. (2001). Location and Mechanism of α 2,6-Sialyltransferase Dimer Formation: ROLE OF CYSTEINE RESIDUES IN ENZYME DIMERIZATION, LOCALIZATION, ACTIVITY, AND PROCESSING. *J. Biol. Chem.* *276*, 28641–28649.
- Rakic, B., Rao, F.V., Freimann, K., Wakarchuk, W., Strynadka, N.C.J., and Withers, S.G. (2013). Structure-based mutagenic analysis of mechanism and substrate specificity in mammalian glycosyltransferases: Porcine ST3Gal-I. *Glycobiology* *23*, 536–545.
- Ramirez, S.C., Ruggiero, F.M., Daniotti, J.L., and Taubas, J.V. (2017). Ganglioside glycosyltransferases are S-acylated at conserved cysteine residues involved in homodimerisation. *Biochem. J.* *474*, 2803–2816.
- Rao, F.V., Rich, J.R., Rakić, B., Buddai, S., Schwartz, M.F., Johnson, K., Bowe, C., Wakarchuk, W.W., DeFrees, S., Withers, S.G., et al. (2009). Structural insight into mammalian sialyltransferases. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *16*, 1186–1188.
- Rivinoja, A., Hassinen, A., Kokkonen, N., Kauppila, A., and Kellokumpu, S. (2009). Elevated Golgi pH impairs terminal N-glycosylation by inducing mislocalization of Golgi glycosyltransferases. *J. Cell. Physiol.* *220*, 144–154.
- Rogers, G.N., Herrler, G., Paulson, J.C., and Klenk, H.D. (1986). Influenza C virus uses 9-O-acetyl-N-acetylneuraminic acid as a high affinity receptor determinant for attachment to cells. *J. Biol. Chem.* *261*, 5947–5951.
- Rohfritsch, P.F., Joosten, J.A.F., Krzewinski-Recchi, M.-A., Harduin-Lepers, A., Laporte, B., Juliant, S., Cerutti, M., Delannoy, P., Vliegenthart, J.F.G., and Kamerling, J.P. (2006). Probing the substrate specificity of four different sialyltransferases using synthetic β -d-Galp-(1→4)- β -d-GlcpNAc-(1→2)- α -d-Manp-(1→O) (CH₂)₇CH₃ analogues: General activating effect of replacing N-acetylglucosamine by N-propionylglucosamine. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* *1760*, 685–692.
- Ruggiero, F.M., Vilcaes, A.A., Iglesias-Bartolomé, R., and Daniotti, J.L. (2015). Critical role of evolutionarily conserved glycosylation at Asn211 in the intracellular trafficking and activity of sialyltransferase ST3Gal-II. *Biochem. J.* *469*, 83–95.
- Salminen, A., and Kaarniranta, K. (2009). Siglec receptors and hiding plaques in Alzheimer's disease. *J. Mol. Med.* *87*, 697.
- Salvolini, E., Giorgio, R.D., Curatola, A., Mazzanti, L., and Fratto, G. (1998). Biochemical modifications of human whole saliva induced by pregnancy. *BJOG Int. J. Obstet. Gynaecol.* *105*, 656–660.
- Samraj, A.N., Läubli, H., Varki, N., and Varki, A. (2014). Involvement of a Non-Human Sialic Acid in Human Cancer. *Front. Oncol.* *4*.
- Samyn-Petit, B., Krzewinski-Recchi, M.-A., Steelant, W.F., Delannoy, P., and Harduin-Lepers, A. (2000). Molecular cloning and functional expression of human ST6GalNAc II. Molecular expression in various human cultured cells. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* *1474*, 201–211.

- Sato, C., Kim, J.-H., Abe, Y., Saito, K., Yokoyama, S., and Kohda, D. (2000). Characterization of the iV-Oligosaccharides Attached to the Atypical Asn-X-Cys Sequence of Recombinant Human Epidermal Growth Factor Receptor. *J Biochem* 127, 9.
- Savill, J., Dransfield, I., Gregory, C., and Haslett, C. (2002). A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 965–975.
- Schegg, B., Hülsmeier, A.J., Rutschmann, C., Maag, C., and Hennet, T. (2009). Core Glycosylation of Collagen Is Initiated by Two $\beta(1-O)$ Galactosyltransferases. *Mol. Cell. Biol.* 29, 943–952.
- Schnaar, R.L., and Kinoshita, T. (2015). Glycosphingolipids. In *Essentials of Glycobiology*, A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko, P. Stanley, G.W. Hart, M. Aebi, A.G. Darvill, T. Kinoshita, N.H. Packer, J.H. Prestegard, et al., eds. (Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press), p.
- Schultz, M.J., Holdbrooks, A.T., Chakraborty, A., Grizzle, W.E., Landen, C.N., Buchsbaum, D.J., Conner, M.G., Arend, R.C., Yoon, K.J., Klug, C.A., et al. (2016). The Tumor-Associated Glycosyltransferase ST6Gal-I Regulates Stem Cell Transcription Factors and Confers a Cancer Stem Cell Phenotype. *Cancer Res.* 76, 3978–3988.
- Scott, K., Gadomski, T., Kozicz, T., and Morava, E. (2014). Congenital disorders of glycosylation: new defects and still counting. *J. Inherit. Metab. Dis.* 37, 609–617.
- Séveno, M., Bardor, M., Paccalet, T., Gomord, V., Lerouge, P., and Faye, L. (2004). Glycoprotein sialylation in plants? *Nat. Biotechnol.* 22, 1351–1352; author reply 1352-1353.
- Shah (1977). Differential effects of EDTA, metal ions, and nucleotides on glycoprotein sialyltransferase activity of serum and liver.pdf.
- Shah, M.M., Fujiyama, K., Flynn, C.R., and Joshi, L. (2003). Sialylated endogenous glycoconjugates in plant cells. *Nat. Biotechnol.* 21, 1470–1471.
- Shan, Y., Liu, Y., Zhao, L., Liu, B., Li, Y., and Jia, L. (2017). MicroRNA-33a and let-7e inhibit human colorectal cancer progression by targeting ST8SIA1. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 90, 48–58.
- Shang, C., and Van Damme, E.J.M. (2014). Comparative analysis of carbohydrate binding properties of Sambucus nigra lectins and ribosome-inactivating proteins. *Glycoconj. J.* 31, 345–354.
- Shen, H.M., and Zhang, Q.F. (1994). Risk assessment of nickel carcinogenicity and occupational lung cancer. *Environ. Health Perspect.* 102, 275–282.
- Silberstein, S., and Gilmore, R. (1996). Biochemistry, molecular biology, and genetics of the oligosaccharyltransferase. *FASEB J.* 10, 849–858.
- Skropeta, D., Schwörer, R., Haag, T., and Schmidt, R.R. (2004). Asymmetric synthesis and affinity of potent sialyltransferase inhibitors based on transition-state analogues. *Glycoconj. J.* 21, 205–219.
- Smith, L.J., Holmes, A.L., Kandpal, S.K., Mason, M.D., Zheng, T., and Wise, J.P. (2014). The cytotoxicity and genotoxicity of soluble and particulate cobalt in human lung fibroblast cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 278, 259–265.
- Spiro, R.G., and Bhojroo, V.D. (1974). Structure of the O-Glycosidically Linked Carbohydrate Units of Fetuin. *J. Biol. Chem.* 249, 5704–5717.

- Stanley, P. (1983). [11] Selection of lectin-resistant mutants of animal cells. In *Methods in Enzymology*, (Academic Press), pp. 157–184.
- Starr, T., Sun, Y., Wilkins, N., and Storrie, B. (2010). Rab33b and Rab6 are Functionally Overlapping Regulators of Golgi Homeostasis and Trafficking. *Traffic* *11*, 626–636.
- Stimson, E., Hope, J., Chong, A., and Burlingame, A.L. (1999). Site-Specific Characterization of the N-Linked Glycans of Murine Prion Protein by High-Performance Liquid Chromatography/Electrospray Mass Spectrometry and Exoglycosidase Digestions [†]. *Biochemistry* *38*, 4885–4895.
- Svensson, E.C. (1992). Regulated Expression of α 2,6-Sialyltransferase by the Liver-enriched Transcription Factors HNF-1, DBP, and LAP. *J. Biol. Chem.* *267*, 1117–1121.
- Takashima, S., Kurosawa, N., Tachida, Y., Inoue, M., and Tsuji, S. (1999). Comparative Analysis of the Genomic Structures and Promoter Activities of Mouse Sialyltransferase Genes (ST6GalNAc III and IV): Characterization of Their Spl Binding Sites. *J. Biochem.* *125*, 111–118.
- Tangvoranuntakul, P., Gagneux, P., Diaz, S., Bardor, M., Varki, N., Varki, A., and Muchmore, E. (2003). Human uptake and incorporation of an immunogenic nonhuman dietary sialic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 12045–12050.
- Taniguchi, A., Yoshikawa, and Matsumoto, K. (2001a). Genomic structure and transcriptional regulation of human Gal β 1,3GalNAc α 2,3-sialyltransferase (hST3Gal I) gene. *Glycobiology* *11*, 241–247.
- Taniguchi, A., Kaneta, R., Morishita, K., and Matsumoto, K. (2001b). Gene Structure and Transcriptional Regulation of Human Gal β 1,4(3) GlcNAc α 2,3-Sialyltransferase VI (hST3Gal VI) Gene in Prostate Cancer Cell Line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *287*, 1148–1156.
- Taniguchi, A., Saito, K., Kubota, T., and Matsumoto, K. (2003a). Characterization of the promoter region of the human Gal β 1,3(4)GlcNAc α 2,3-sialyltransferase III (hST3Gal III) gene. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Struct. Expr.* *1626*, 92–96.
- Taniguchi, A., Hioki, M., and Matsumoto, K. (2003b). Transcriptional regulation of human Gal β 1,3GalNAc/Gal β 1, 4GlcNAc α 2,3-sialyltransferase (hST3Gal IV) gene in testis and ovary cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *301*, 764–768.
- Teinturier-Lelièvre, M., Julien, S., Juliant, S., Guerardel, Y., Duonor-Cérutti, M., Delannoy, P., and Harduin-Lepers, A. (2005). Molecular cloning and expression of a human hST8Sia VI (α 2,8-sialyltransferase) responsible for the synthesis of the diSia motif on O-glycosylproteins. *Biochem. J.* *392*, 665–674.
- Teppa, R.E., Petit, D., Plechakova, O., Cogez, V., and Harduin-Lepers, A. (2016). Phylogenetic-Derived Insights into the Evolution of Sialylation in Eukaryotes: Comprehensive Analysis of Vertebrate β -Galactoside α 2,3/6-Sialyltransferases (ST3Gal and ST6Gal). *Int. J. Mol. Sci.* *17*, 1–12.
- Tertov, V.V., Nikonova, E.Y., Nifant'ev, N.E., Bovin, N.V., and Orekhov, A.N. (2002). Human Plasma trans Sialidase Donor and Acceptor Specificity. *J. Biol. Chem.* *277*, 6–11.
- Thompson, M.G., Foley, D.A., and Colley, K.J. (2013). The Polysialyltransferases Interact with Sequences in Two Domains of the Neural Cell Adhesion Molecule to Allow Its Polysialylation. *J. Biol. Chem.* *288*, 7282–7293.

- Tsuji, S., Datta, A.K., and Paulson, J.C. (1996). Letters to the Glyco-Forum: Systematic nomenclature for sialyltransferases. *Glycobiology* 6, 647–647.
- Tsutsui, Y., Ramakrishnan, B., and Qasba, P.K. (2013). Crystal Structures of β -1,4-Galactosyltransferase 7 Enzyme Reveal Conformational Changes and Substrate Binding. *J. Biol. Chem.* 288, 31963–31970.
- Vallejo-Ruiz, V., Haque, R., Mir, A.-M., Schwientek, T., Mandel, U., Cacan, R., Delannoy, P., and Harduin-Lepers, A. (2001). Delineation of the minimal catalytic domain of human GalL1-3GalNAc K2, 3-sialyltransferase (hST3Gal I). *Biochim. Biophys. Acta* 1549, 173.
- Valliere-Douglass, J.F., Kodama, P., Mujacic, M., Brady, L.J., Wang, W., Wallace, A., Yan, B., Reddy, P., Treuheit, M.J., and Balland, A. (2009). Asparagine-linked Oligosaccharides Present on a Non-consensus Amino Acid Sequence in the CH1 Domain of Human Antibodies. *J. Biol. Chem.* 284, 32493–32506.
- Van Damme, T., Pang, X., Guillemyn, B., Gulberti, S., Syx, D., De Rycke, R., Kaye, O., de Die-Smulders, C.E.M., Pfundt, R., Kariminejad, A., et al. (2018). Biallelic B3GALT6 mutations cause spondylodysplastic Ehlers–Danlos syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 27, 3475–3487.
- Varki, A. (1997). Sialic acids as ligands in recognition phenomena. *FASEB J.* 11, 248–255.
- Varki, A. (2017). Are humans prone to autoimmunity? Implications from evolutionary changes in hominin sialic acid biology. *J. Autoimmun.* 83, 134–142.
- Varki, A., and Gagneux, P. (2012). Multifarious roles of sialic acids in immunity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1253, 16–36.
- Varki, A., and Schauer, R. (2009). *Sialic Acids* (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Varki, A., Cummings, R.D., Esko, J.D., Freeze, H.H., Stanley, P., Marth, J.D., Bertozzi, C.R., Hart, G.W., and Etzler, M.E. (2009). Symbol nomenclature for glycan representation. *Proteomics* 9, 5398–5399.
- Varki, A., Schnaar, R.L., and Schauer, R. (2015). Sialic Acids and Other Nonulosonic Acids. In *Essentials of Glycobiology*, A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko, P. Stanley, G.W. Hart, M. Aebi, A.G. Darvill, T. Kinoshita, N.H. Packer, J.H. Prestegard, et al., eds. (Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press), p.
- Vishwanathan, N., Yongky, A., Johnson, K.C., Fu, H.-Y., Jacob, N.M., Le, H., Yusufi, F.N., Lee, D.Y., and Hu, W.-S. (2015). Global insights into the Chinese hamster and CHO cell transcriptomes. *Biotechnol. Bioeng.* 112, 965–976.
- Wang, B., and Brand-Miller, J. (2003). The role and potential of sialic acid in human nutrition. *Eur. J. Clin. Nutr.* 57, 1351–1369.
- Wang, B., Miller, J.B., McNeil, Y., and McVeagh, P. (1998). Sialic Acid Concentration of Brain Gangliosides: Variation Among Eight Mammalian Species. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 119, 435–439.
- Wang, P.-H., Feng Li, Y., Juang, C.-M., Lee, Y.-R., Chao, H.-T., Tsai, Y.-C., and Yuan, C.-C. (2001). Altered mRNA Expression of Sialyltransferase in Squamous Cell Carcinomas of the Cervix. *Gynecol. Oncol.* 83, 121–127.

- Washiya, K., Furuike, T., Nakajima, F., Lee, Y.C., and Nishimura, S.-I. (2000). Design of Fluorogenic Substrates for Continuous Assay of Sialyltransferase by Resonance Energy Transfer. *Anal. Biochem.* *283*, 39–48.
- Wei, A., Fan, B., Zhao, Y., Zhang, H., Wang, L., Yu, X., Yuan, Q., Yang, D., and Wang, S. (2016). ST6Gal-I overexpression facilitates prostate cancer progression via the PI3K/Akt/GSK-3 β /catenin signaling pathway. *Oncotarget* *7*.
- Worrell, B.T., Malik, J.A., and Fokin, V.V. (2013). Direct Evidence of a Dinuclear Copper Intermediate in Cu(I)-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloadditions. *Science* *340*, 457–460.
- Wu, Z.L., Ethen, C.M., Prather, B., Machacek, M., and Jiang, W. (2011). Universal phosphatase-coupled glycosyltransferase assay. *Glycobiology* *21*, 727–733.
- Xu, L., Kurusu, Y., Takizawa, K., Tanaka, J., Matsumoto, K., and Taniguchi, A. (2003). Transcriptional regulation of human β -galactoside α 2,6-sialyltransferase (hST6Gal I) gene in colon adenocarcinoma cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *307*, 1070–1074.
- Yamamoto, H., Oviedo, A., Sweeley, C., Saito, T., and Moskal, J.R. (2001). α 2,6-Sialylation of Cell-Surface N-Glycans Inhibits Glioma Formation in Vivo. *Cancer Res.* *61*, 6822–6829.
- Yang, L.J.S., Lorenzini, I., Vajn, K., Mountney, A., Schramm, L.P., and Schnaar, R.L. (2006). Sialidase enhances spinal axon outgrowth in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *103*, 11057–11062.
- Yoon, H.-K., An, H.-K., Ko, M.J., Kim, K.-S., Mun, S.-W., Kim, D.-H., Kim, C.M., Kim, C.-H., Choi, Y.W., and Lee, Y.-C. (2016). Upregulation of Human ST8Sia VI (α 2,8-Sialyltransferase) Gene Expression by Physcion in SK-N-BE(2)-C Human Neuroblastoma Cells. *Int. J. Mol. Sci.* *17*.
- Yoshida, Y., Kurosawa, N., Kanematsu, T., Kojima, N., and Tsuji, S. (1996a). Genomic Structure and Promoter Activity of the Mouse Polysialic Acid Synthase Gene (mST8Sia II) BRAIN-SPECIFIC EXPRESSION FROM A TATA-LESS GC-RICH SEQUENCE. *J. Biol. Chem.* *271*, 30167–30173.
- Yoshida, Y., Kurosawa, N., Kanematsu, T., Taguchi, A., Arita, M., Kojima, N., and Tsuji, S. (1996b). Unique genomic structure and expression of the mouse α 2,8-sialyltransferase (ST8Sia III) gene.
- Yu, S.-H., Zhao, P., Sun, T., Gao, Z., Moremen, K.W., Boons, G.-J., Wells, L., and Steet, R. (2016). Selective Exo-Enzymatic Labeling Detects Increased Cell Surface Sialoglycoprotein Expression upon Megakaryocytic Differentiation. *J. Biol. Chem.* *291*, 3982–3989.
- Zhang, Z., Wuhrer, M., and Holst, S. (2018). Serum sialylation changes in cancer. *Glycoconj. J.* *35*, 139–160.
- Zlatina, K., Saftenberger, M., Kühnle, A., Galuska, C., Gärtner, U., Rebl, A., Oster, M., Vernunft, A., and Galuska, S. (2018). Polysialic Acid in Human Plasma Can Compensate the Cytotoxicity of Histones. *Int. J. Mol. Sci.* *19*, 1679.