

Université des Sciences et Technologies de Lille1 Discipline : Sciences Naturelles

Habilitation à Diriger des recherches

Présentée par

Frédéric CHIRAT

Etude de la structure primaire des protéines et des modifications co- et post-traductionnelles : Application à l'étude de la *N*- et *O*glycosylation des glycoprotéines de patients atteints de mucopolysaccharidoses de type I.

Président	:	Dr Guy LIPPENS
Directeur	:	Jean Claude MICHALSKI
Rapporteurs	:	Jean Louis GOERGEN
		Thierry VALADE
		Stuart MOORE
Examinateur	:	Fabrice ALLAIN

Soutenue le 20 novembre 2008

A Guylaine, Bastien et Romain

A mes parents

REMERCIEMENTS

J'adresse mes plus sincères remerciements à Messieurs les membres du jury pour le temps qu'ils ont consacré à la lecture de mon mémoire et à l'évaluation de mes activités de recherches dans le cadre de ma candidature à l'obtention de l'Habilitation à Diriger des Recherches.

Si je devais remercier toutes celles et tous ceux qui m'ont aidé d'une façon ou d'une autre au cours de mes différentes activités de recherches, la liste serait longue. Plutôt que de me livrer à cet exercice, je souhaite les associer aux remerciements que j'adresse aux différents Directeurs ou Responsables de laboratoire qui m'ont accueilli depuis ma thèse, à savoir :

> P.SAUTIERE pour m'avoir donné le goût de la recherche,

➢ A.TARTAR qui, de par le sujet qu'il m'a confié, m'a permis d'apprécier les différences qui existent entre une recherche fondamentale et une recherche finalisée,

➢ J.P. COLBEAUX et J.KREMBEL qui, à l'issue de mon stage postdoctoral, m'ont conduit avec bienveillance jusqu'à mon poste de Maître de Conférences,

➢ A.VERBERT, qui m'a accueilli au sein de l'UMR 8576 du CNRS et a guidé mes premiers pas en glycobiologie,

➢ R.CACAN qui m'a fait partager sa passion et sa vision pragmatique de la recherche,

J.C. MICHALSKI pour la confiance qu'il m'a accordée lorsque j'ai souhaité rejoindre son groupe de recherche, tout particulièrement le groupe de glycopathologie, afin d'allier mes compétences acquises dans l'étude structurale des glycannes et celles de leur biosynthèse.

Enfin, un grand merci à Fabrice, Daniel, Sandrine, Bernadette, François et Anne Sophie pour leurs remarques pertinentes ainsi qu'à Nadège, Gaëlle, et Jacqueline pour la gestion administrative de mon HDR.

ABREVIATIONS

AA	: Acide Aminé
ADN	: Acide desoxyribo nucléique
ALG	: Asparagine Linked Glycan
AMP	: Adénosine Mono Phosphate
ANRS	: Agence Nationale de la Recherche sur le Sida
ARN	: Acide ribo nucléique
ARNm	: Acide ribonucléique messager
AP	: Alkaline Phosphatase
ATP	: Adénosine 5'Tri Phosphate
CD	: Cluster of Differenciation
CDG	: Congenital Disorder of Glycosylation
СНО	: Chinese Hamster Ovarian
CMH-I	: Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe I
CMH-II	: Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II
CMP	: Cytosine 5'Mono Phosphate
CNRS	: Centre National de la Recherche Scientifique
CNX	: Calnexine
CRT	: Calréticuline
COG	: Conserved oligomeric Golgi
ConA	: Concanavaline A
CS	: Chondroïtine Sulfate
CTL	: Cytotoxic T Lymphocyte (Lymphocyte T Cytotoxique)
DEA	: Diplôme d'Etudes Approfondies
Dol	: Dolichol
Dol-P	: Dolichyl Phosphate
Dol-P-Glc	: Dolichyl Phosphate Glucose
Dol-P-Man	: Dolichyl Phosphate Mannose
DS	: Dermatane Sulfate
EDTA	: Ethylène Diamine Tétra Acétique
EDEM	: ER degradation enhancing α -mannosidase-like protein
EPO	: Erythropoïétine
EPOhr	: Erythropoïétine humaine recombinante
ERAD	: Endoplasmic Reticulum Associated Degradation
ERGIC	: Endoplasmic Reticulum/Golgi Intermediate Compartment
ESI-MS	: ElectroSpray-Mass Spectrometry
FAB-MS	: Fast Atom Bombardment-Mass Spectrometry
GAG	: GlycosAminoGlycanne
GC-MS	: Gas Chromatography-Mass Spectrometry
GDP	: Guanosine 5'Di Phosphate
GM2	: Ganglioside Monosialylé
~	GalNAc (β 1-4) [NeuAc (α 2-3)] Gal (β 1-4) Glc(β 1)-Céramide
GM3	: Ganglioside Monosialylé
	NeuAc (α 2-3) Gal (β 1-4) Glc(β 1)-Céramide
GMP	: Guanosine 5'Mono Phosphate
Gp	: Glycoprotéine
	AA ADN ALG AMP ANRS ARN ARN ARN AP ATP CD CD CDG CHO CMH-I CMH-II CMH-II CMH-II CMP CNRS CNX CRT COG ConA CS CTL DEA Dol Dol-P Dol-P-Glc Dol-P-Man DS EDTA EDEM EDO EPOhr ERAD ERGIC ESI-MS FAB-MS GAG GC-MS GDP GM2

GRP	: Glucose Regulated Protein
HDA	: Hexa Decanoïc Acid
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography
HS	: Héparane Sulfate
HSP	: Heat Shock Protein
IFN-γ	: Interféron gamma
INSERM	: Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale
kDa	: kilo Dalton
KS	· Kératane Sulfate
LAMP	· Lysosome Associated Membrane Protein
LacNac	· N-acetyl Lactosamine
LCA	· Lens Culinaris Agglutinin
Left	· Lactoferrine
L fb	: Lactoferrine boyine
L fbr	: Lactoferrine bovine recombinante
L fh	: Lactoferrine bumaine
L fhrm	: L'actoferrine humaine recombinante produite dans le maïs
L fbrt	: L'actoferrine humaine recombinante produite dans le tabac
	: Lactorennie numarie recombinante produite dans le tabac
	: Laboratorie Français du Fractionnement et des Diotechnologies
	: Lysosomel Storage Disease
LSD MAI DI TOE MS	: Lysosonial Storage Disease : Matrix Assisted Laser Description/Ionisation Time Of Flight Mass
MALDI-TOF-MS	Spectrometry
MPS	: MucoPolySaccharidose
MS	: Mass Spectrometry
OS	: OligoSaccharide
OS-gn1	: OligoSaccharide avec 1 GlcNAC à l'extrêmité réductrice
OS-gn2	: OligoSaccharide avec 2 GlcNAC à l'extrêmité réductrice
OST	: Oligo Saccharyl Transférase
P3CSS	: triPalmitoyl-S-Glyceryl-Seryl-Serine
PAGE	: PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
PAts	: Phosphatase Alcaline tronquée secrétée
PBS	: Phosphate Buffer Saline
PDI	: Peptidyl Disulfide Isomerase
PPI	: Peptidyl Prolyl cis-trans Isomerase
PD-MS	: Plasma Desorption-Mass Spectrometry
PF-BDM	: Protein-Free Basal Defined Medium
PNGase F	: Peptidyl N-Glycanase F
PVDF	: PolyVinylidene Di Fluoride
RPE	: Retinal Pigmented Epithelium
SF-RPMI	: Serum Free Roswell Park Memorial Institute medium
RT-PCR	: Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
SDS	: Sodium Dodecyl Sulfate
SIDA	: Syndrome de l'Immuno Déficience Acquise
SNA	: Sambucus nigra agglutinin
ТАР	: Transporter associated with Antigen Processing
Тс	· lymphocyte T cytotoxique
Tf	: Transferase
Th	: lymphocyte T helper
TP	: Transition Protein

UDP	: Uridine 5'Di Phosphate
UGGT	: UDP-Glc :Glycoprotein Glucosyl Transferase
uma	: unité de masse atomique
UDP	: Uridine 5'Di Phosphate
UMP	: Uridine 5'Mono Phosphate
UTP	: Uridine 5'Tri Phosphate
UMR	: Unité Mixte de Recherches
UPR	: Unfolded Protein Response
URA	: Unité de Recherches Associée
VIH	: Virus de l'Immunodéficience Humaine
VIS	: Virus de l'Immunodéficience Simienne
WGA	: Wheat Germ Agglutinin

Acide Aminé	Code à 3 lettres	Code à 1 lettre
Glycine	Gly	G
Alanine	Ala	А
Valine	Val	V
Leucine	Leu	L
Isoleucine	Ile	Ι
Serine	Ser	S
Thréonine	Thr	Т
Cystéine	Cys	С
Méthionine	Met	М
Acide aspartique	Asp	D
Acide Glutamique	Glu	E
Asparagine	Asn	Ν
Glutamine	Gln	Q
Arginine	Arg	R
Lysine	Lys	K
Histidine	His	Н
Tryptophane	Trp	W
Phenylalanine	Phe	F
Tyrosine	Tyr	Y
Proline	Pro	Р

Abréviation des Monosaccharides

Fuc	Fucose
Glc	Glucose
GlcNAc	<i>N</i> -acetyl glucosamine
Gal	Galactose
GalNAc	N-acetyl galactosamine
NeuAc	Acide N-acetyl neuraminique
Xyl	Xylose
Man	Mannose
GlcA	Acide glucuronique

SOMMAIRE

Résumé	1
Curriculum vitae	2
Liste des publications	6
Avant propos	10
Travaux de recherches en thèse	12
I- Généralités	13
II- Etude de la spermiogenèse du bélier Ovis aries	14
II-1 Etude de la protéine de transition P de bélier	15
II-2 Etude de la structure primaire de la protéine 3 de bélier	17
III- Conclusion générale	18
Travaux de recherches post-doctorales	20
I- Généralité sur la réponse Cellulaire T Cytotoxique	21
II- Principaux résultats	22
II-1 Etude de la réponse cellulaire T cytotoxique induite par les lipopeptides	22
II-2 Etude de la réponse cellulaire T cytotoxique induite par les lipopeptides	
chez le macaque	24
III- Conclusion générale	25
Travaux de recherches à l'UMR 8576 CNRS	27
A) Généralités	28
I- La <i>N</i> - et la <i>O</i> -glycosylation : généralités	28
II- Biosynthèse des <i>N</i> -glycanes	29
II-1 Biosynthèse du Glc ₃ -Man ₉ -GlcNAc ₂ -P-P-Dol	30
II-1-1 La phase cytosolique	30
II-1-2 La phase luminale	30
II-2 Transfert du Glc3-Man9-GlcNAc2 sur une protéine en voie de synthèse	31
II-3 La maturation des <i>N</i> -glycanes	31
III- Biosynthèse des O-glycanes	33
B) Caractérisation de la glycosylation de glycoprotéines recombinantes	35
I- Généralités	35

II- Caractérisation de la glycosylation d'érythropoïétines humaines recombinantes	
produites dans une lignée cellulaire de mammifère 3	36
II-1 Stratégie d'études	37
II-2 Principales conclusions	38
III- Caractérisation de la glycosylation de la lactoferrine humaine recombinante	
produite dans des cellules de plantes	10
III-1 Stratégie d'études 4	40
III-2 Principales conclusions 4	40
IV- Caractérisation de la glycosylation de la lactoferrine bovine recombinante	
produite dans des cellules d'insecte 4	41
V- Conclusion générale 4	12
C) Etude du devenir des glycoprotéines nouvellement synthétisées 4	14
I- Introduction	14
II- Principaux résultats	16
II-1 Relation entre l' α 1-2 mannosidase réticulaire et l'UGGT	16
II-2 Effet de l' α 1-2 mannsidase réticulaire sur la réponse UPR	19
II-3 Dégradation préférentielle des glycoprotéines portant des glycannes	
tronquées	50
II-4 Etude des Dol-P-P-OS au cours de la production de l'IFN-γ par des	
cellules CHO	51
III Conclusion générale 5	53
D) Etablissement du <i>N</i> - et <i>O</i> -glycome sérique dans un contexte	
pathologique	54
I Introduction	54
I-1 Les maladies innées de la glycosylation	54
I-2 Les maladies acquises de glycosylation	55
I-3 Les techniques d'analyses du glycome	56
II- Mise au point d'une approche glycomique pour le dépistage de défauts de	0
biosynthèse des <i>N</i> - et/ou <i>O</i> -glycannes	58

Projets de recherches	60
I- Les maladies d'accumulation lysosomale	61
II- Lysosome	61
II-1 Les différentes voies de dégradation	61
II-2 L'adressage des hydrolases au lysosome	62
II-3 Les différentes maladies d'accumulation lysosomales	63
II-3-1 Les différentes causes	63
II-3-2 Classification des LSD	64
III- Les mucopolysaccharidoses	65
III-1 Structure des différents glycosaminoglycannes	65
III-2 Le catabolisme des chaines GAG	67
III-2-1 Action des endoglycosidases	67
III-2-2 Action séquentielle des exoglycosidases et exosulfatases	68
IV- Principales perturbations métaboliques observées au cours de LSD	68
V- Etude de la glycosylation au cours de mucopolysaccharidoses de type I	70
V-1 Choix de la pathologie étudiée	71
V-2 Etude du glycome cellulaire et sérique de patients atteints de MPS-I	71
V-2-1 Comparaison des glycomes sérique de patients sains vs patients	
atteints de MPS I	71
V-2-2 Comparaison des glycomes de fibroblastes de patients sains vs	
patients atteints de MPS-I	72
V-3 Etude du glycoprotéome lysosomal	72
V-3-1 Préparation des lysosomes	73
V-3-2 Comparaison du glycoprotéome de lysosomes sains vs lysosomes	
de fibroblastes atteints de MPS-I	74
V- 4 Conclusion	76
Bibliographie	78

Résumé

Mes activités de recherches ont débuté en 1987 lors de ma thèse de doctorat en biochimie à l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille sous la direction du Dr P.Sautière. Cette première expérience m'a permis d'acquérir une compétence dans l'extraction, la purification et la caractérisation structurale des protéines associées à l'ADN.

J'ai ensuite effectué un stage post-doctoral de 2 ans à l'Institut Pasteur de Lille sous la direction du Pr A.TARTAR sur une thématique vaccinale anti-VIH. Dans ce cadre, j'ai réalisé la synthèse et la purification de peptides choisis parmi la glycoprotéine gp120 du VIH et les glycoprotéines Gag et Nef du virus simien de l'immunodéficience acquise, sur lesquels un motif lipidique avait été introduit pour induire une réponse cellulaire T cytotoxique.

Mes compétences dans l'étude de la structure des protéines (structure primaire et localisation de modifications post-traductionnelles) m'ont permis d'être recruté à l'UMR 8576 du CNRS, en 1994, sur un poste de maître de conférences en glycobiologie. J'ai effectué mes premiers pas dans ce domaine en déterminant la structure primaire des différentes chaînes glycanniques arborées par des glycoprotéines recombinantes produites dans différents modèles cellulaires. En 1999, j'ai souhaité intégrer le groupe du Pr R.Cacan afin d'acquérir une compétence dans la biosynthèse et le devenir des N-glycosylprotéines.

Lors du dernier plan quadriennal de l'unité, j'ai rejoint le groupe « glycobiologie de la signalisation cellulaire » dirigé par Jean Claude Michalski dont l'un des thèmes de recherche est la mise au point de méthodologies, essentiellement basées sur la spectrométrie de masse, pour la mise en évidence de changements structuraux au niveau des glycannes des glycoprotéines intervenant au cours de certaines pathologies.

Je souhaite poursuivre mon activité de recherche en comparant le potentiel de glycosylation de fibroblastes humains sains versus fibroblastes humains atteints d'une mucopolysaccharidose de type I (MPS-I). Les mécanismes physiopathologiques de ces maladies sont encore très mal connus et l'objectif de notre travail est de mettre en évidence des changements dans la glycosylation des glycoprotéines qui pourraient être impliquées dans certains des dysfonctionnements cellulaires observés.

CURRICULUM

VITAE

Frédéric CHIRAT Maître de Conférences en Biochimie

44 ans, marié, 2 enfants

PARCOURS UNIVERSITAIRE

Depuis 1994	Maître de Conférences, section 64 - UMR 8576 CNRS Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle (<i>Dir.</i> : Dr. JC. Michalski) Université Lille 1		
1993-94	Poste d'ATER en Biochimie et Chimie Organique Université du Littoral et de la Côte d'Opale		
1991-93	Chercheur post-doctoral - U.R.A 1309 CNRS Laboratoire de Chimie des Biomolécules - Institut Pasteur de Lille Financé par l'Agence Nationale des Recherches sur le Sida (ANRS). <i>Directeur</i> : Pr. A. TARTAR Synthèse, purification et caractérisation de peptides et pseudopeptides à visée vaccinale anti-VIH		
1990	Doctorat des Sciences de la Vie et de la Santé, option Biochimie Unité n°409 du CNRS à l'Institut de Recherche sur le Cancer de Lille. Les protéines nucléaires basiques de la spermiogénèse du bélier <i>ovis aries :</i> structure primaire, phosphorylation Mention très honorable - <i>Directeur de Thèse</i> : Dr. P. SAUTIERE		
1987	D.E.A des Sciences de la Vie et de la Santé - Mention bien Unité n°409 du CNRS à l'Institut de Recherche sur le Cancer de Lille. La technique d'électrotransfert : Application aux études structurales de protéines basiques associées à l'ADN		
1984 & 1985	Licence (mention B) et Maîtrise de Biochimie (mention AB) - Université Lille 1		
1983	BTS de Biochimie - Lycée Privé St Charles à Arras		
1981	Baccalauréat F7 (Biochimie) - Lycée Privé St Charles à Arras		

ACTIVITES DE RECHERCHE

depuis 1994 A l'UMR 8576 du CNRS- Université Lille 1

Caractérisation structurale par spectrométrie de masse des chaînes glycanniques des glycoprotéines sériques et cellulaires lors de pathologies innées ou acquises de la glycosylation (depuis 2003).

Caractérisation structurale des glycannes de glycoprotéines recombinantes exprimées dans différents modèles cellulaires (jusqu'en 2000).

Etude des premières étapes de la N-glycosylation et du devenir des glycoprotéines néosynthétisées dans le *réticulum* endoplasmique (de 2000 à 2003).

- **1991-93** Synthèse, purification et caractérisation de peptides et pseudopeptides à visée vaccinale anti-VIH
- **1987-90** Les protéines nucléaires basiques de la spermiogénèse du bélier *ovis aries* : structure primaire, phosphorylation

RESPONSABILITE & ENCADREMENT D'ETUDIANTS EN RECHERCHE

- 1994-98 Codirection avec D.BOURREL (LFB Lille) de la thèse de doctorat de D. COINTE sur le thème « Etude de la glycosylation de l'érythropoïétine humaine recombinante produite dans des cellules lymphoblastoïdes humaines » (soutenance en 1998)
 2002.04 Codirection avec P. CACAN du DEA de E. FOUL OUEP.
- 2003-04 Codirection avec R.CACAN du DEA de F. FOULQUIER

RESPONSABILITE & ENCADREMENT D'ETUDIANTS depuis 2004

2008	HANNOUN	Sarah	Master 1 (Université Lille I)	100 heures
	DUCARNE	Laetitia	BTS Bioanalyses et Contrôles (Lycée Arras)	2 mois 1/2
	DEFRETIN	Vincent	3 ^{ème} (Collège Le Parc Haubourdin)	1 semaine
2007	JEBALI	Farouk	Master 1 (Université Lille I)	100 heures
	WILLE	Kevin	Master 1 (Université Lens)	2 mois 1/2
	BONNIER	Jérôme	BTS Bioanalyses et Contrôles (Lycée Arras)	2 mois 1/2
	POLAERT	Hélène	BTS Anabiotec (Douai)	2 mois 1/2
	BLIECQ	Alison	3 ^{ème} (Collège Le Parc Haubourdin)	1 semaine
	CLUSMAN	Aurélie	4 ^{ème} (Collège B. Ligny)	1 semaine
2006	ROMBOUTS	Yoann	Master 1 (Université Lille I)	100 heures
	PEUCELLE	Mathilde	1 ^{ère} S (Lycée Armentières)	1 semaine
2005	CANIS	Kevin	Master 1 (Université Lille I)	100 heures
	PLANQUE	Julie	BTS Analyses Agricoles Biologiques et Biotechnologies (Corbie, 80)	2 mois 1/2
2004	JELONKIEWLCZ	Laure	DEUG Sciences Vie (Université Lille I)	5 mois 1/2

RESPONSABILITES & ACTIVITES D'ENSEIGNEMENT

depuis 2004	Directeur des Etudes et Président de Jury (environ 450 étudiants) Licence Sciences et Technologies S.V.T.E, semestre 3		
	Responsable du module « du protéome à la protéine active » Master biologie-biotechnologie 1 ^{ère} année.		
2002-04	Président de Jury (environ 500 étudiants) DEUG Sciences de la Vie - 2 ^{ème} année.		
jusqu'en 2004	Responsable des Travaux Dirigés & Pratiques de biochimie (environ 500 étudiants) DEUG Sciences de la Vie 2 ^{ème} année.		
1994 - 2004	Enseignement en Master Biologie-Biotechnologie 1 ^{ère} année et Maîtrise de Biochimie (CM, TD et TP)		
	Enseignement en Licence SVTE, 2 ^{ème} et 3 ^{ème} année (CM, TD et TP)		
	Enseignement en DEUST-DQPA 2 ^{ème} année (TD et TP)		
1993-94	Université du Littoral (ATER) Enseignement de biochimie et de chimie organique (CM, TD et TP) à l'IUP de Boulogne sur Mer et l'université de Calais.		

ACITIVTES CONNEXES

Depuis 2007	<i>Université de l'Artois</i> Membre de la commission de spécialistes
Depuis 2003	<i>Université Lille 1</i> Membre de la Commission des Athlètes de Haut Niveau Membre élu au Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire (CEVU) Participation aux activités de la cellule « Relation Lycée Université »
Depuis 2000	Président adjoint des jurys de délibération du BTS de Biochimie

LISTE DES PUBLICATIONS

- Chirat F., Belaiche D., Malki N. and Han K.K. (1989)
 'In situ' Edman degradation of protein(s) blotted to immobilon membranes suitable for unblocking reversible chemical modification and elimination of coomassie blue in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis Biomed. Chromatogr., **3**, 173-176.
- Chirat F., Balduyck M., Mizon C., Laroui S., Sautiere P. and Mizon J. (1991) A chondroitin-sulfate chain is located on serine-10 of the urinary trypsin inhibitor. Int. J. Biochem., 23, 1201-1203.
- Chirat F., Martinage A., Briand G., Kouach M., Van Dorsselaer A., Loir M. and Sautiere P. (1991) Nuclear transition protein 1 from ram elongating spermatids. Mass spectrometric characterization, primary structure and phosphorylation sites of two variants. Eur. J. Biochem. 1991, **198**, 13-20
- Martinon F., Gras-Masse H., Boutillon C., Chirat F., Deprez B., Guillet J.G., Gomard E., Tartar A. and Levy J.P. (1992) Immunization of mice with lipopeptides bypasses the prerequisite for adjuvant. Immune response of BALB/c mice to human immunodeficiency virus envelope glycoprotein. Immunol., 149, 3416-3422.
- Chirat F., Arkhis A., Martinage A., Jaquinod M., Chevaillier P. and Sautière P. (1993)
 Phosphorylation of human sperm protamines HP1 and HP2: identification of phosphorylation sites.
 Biochim. Biophys. Acta., 1203, 109-114.
- Bourgault I., Chirat F., Tartar A., Levy J.P., Guillet J.G. and Venet A. (1994) Simian immunodeficiency virus as a model for vaccination against HIV. Induction in rhesus macaques of GAG- or NEF-specific cytotoxic T lymphocytes by lipopeptides. J. Immunol., 152, 2530-2537.
- Lemoine J., Chirat F. and Domon B. (1996) Structural analysis of derivatized oligosaccharides using post-source decay matrixassisted laser desorption/ionization mass spectrometry. J. Mass. Spectrom. 31, 908-912.
- Lopez M., Coddeville B., Langridge J., Plancke Y., Sautière P., Chaabihi H., Chirat F., Harduin-Lepers A., Cerutti M., Verbert A. and Delannoy P. (1997) Microheterogeneity of the oligosaccharides carried by the recombinant bovine lactoferrin expressed in Mamestra brassicae cells. Glycobiology, 7, 635-651.
- Lemoine J., Chirat F., Wieruszeski J.M., Strecker G., Favre N. and Neeser J.R. (1997)
 Structural characterization of the exocellular polysaccharides produced by Streptococcus thermophilus SFi39 and SFi12. Appl. Environ. Microbiol., 63, 3512-3518.

- 10. Cointe D., Leroy Y. and Chirat F. (1998)
 Determination of the sialylation level and of the ratio alpha-(2-->3)/alpha-(2-->6) sialyl linkages of N-glycans by methylation and GC/MS analysis. Carbohydr. Res., **311**, 51-59.
- 11. Chevaillier P., Chirat F. and Sautière P. (1998) The amino acid sequence of the ram spermatidal protein 3--a transition protein TP3 or TP4? Eur. J. Biochem., 258, 460-464.
- Duvet S., Chirat F., Mir A.M., Verbert A., Dubuisson J. and Cacan R. (2000) Reciprocal relationship between alpha1,2 mannosidase processing and reglucosylation in the rough endoplasmic reticulum of Man-P-Dol deficient cells. Eur. J. Biochem., 267, 1146-1152.
- Cointe D., Beliard R., Jorieux S., Leroy Y., Glacet A., Verbert A., Bourel D. and Chirat F. (2000) Unusual N-glycosylation of a recombinant human erythropoietin expressed in a human lymphoblastoid cell line does not alter its biological properties. Glycobiology, 10, 511-519.
- 14. Foulquier F., Harduin-Lepers A., Duvet S., Marchal I., Mir A.M., Delannoy P., Chirat F. and Cacan R. (2002)
 The unfolded protein response in a dolichyl phosphate mannose-deficient Chinese hamster ovary cell line points out the key role of a demannosylation step in the quality-control mechanism of N-glycoproteins. Biochem. J., 362, 491-498.
- Guerardel Y., Maes E., Briken V., Chirat F., Leroy Y., Locht C., Strecker G. and Kremer L. (2003)
 Lipomannan and lipoarabinomannan from a clinical isolate of Mycobacterium kansasii: novel structural features and apoptosis-inducing properties.
 J. Biol. Chem., 278, 36637-36651.
- Samyn-Petit B., Wajda Dubos J.P., Chirat F., Coddeville B., Demaizieres G., Farrer S., Slomianny M.C., Theisen M. and Delannoy P. (2003) Comparative analysis of the site-specific N-glycosylation of human lactoferrin produced in maize and tobacco plants. Eur. J. Biochem., 270, 3235-3242.
- Foulquier F., Duvet S., Klein A., Mir A.M., Chirat F. and Cacan R. (2004) Endoplasmic reticulum-associated degradation of glycoproteins bearing Man5GlcNAc2 and Man9GlcNAc2 species in the MI8-5 CHO cell line. Eur. J. Biochem., 271, 398-404.

- Duvet S., Foulquier F., Mir A.M., Chirat F., Cacan R. (2004) Discrimination between lumenal and cytosolic sites of deglycosylation in endoplasmic reticulum-associated degradation of glycoproteins by using benzyl mannose in CHO cell lines. Glycobiology, 14, 841-849.
- Kochanowski N., Blanchard F., Cacan R., Chirat F., Guedon E., Marc A., Goergen J.L. (2006) Intracellular nucleotide and nucleotide sugar contents of cultured CHO cells determined by a fast, sensitive, and high-resolution ion-pair RP-HPLC. Anal Biochem., 348, 243-251.
- 20. Morelle W., Canis K., **Chirat** F., Faid V. and Michalski J.C. (2006) The use of mass spectrometry for the proteomic analysis of glycosylation. Proteomics, **6**, 3993-4015.
- 21. Faid V., Chirat F., Seta N., Foulquier F. and Morelle W. (2007) A rapid mass spectrometric strategy for the characterization of N- and O-glycan chains in the diagnosis of defects in glycan biosynthesis. Proteomics, 7, 1800-1813.
- 22. Kochanowski N., Blanchard F., Cacan R., Chirat F., Guedon E., Marc A. and Goergen J.L. (2008)
 Influence of intracellular nucleotide and nucleotide sugar contents on recombinant interferon-gamma glycosylation during batch and fed-batch cultures of CHO cells. Biotechnol. Bioeng., 100, 721-733.

Avant propos

Ma carrière de chercheur a débuté en 1987 lors de ma thèse de doctorat en biochimie à l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille sous la direction du Dr P.Sautière. Cette première expérience m'a permis d'acquérir une solide expérience dans l'extraction, la purification et la caractérisation structurale des protéines, notamment les protéines structurales (histones, protéines de transition et protamine) associées à l'ADN.

Si au sein d'une protéine, chaque acide aminé a son importance, la propriété biologique repose néanmoins sur une zone souvent restreinte de celle-ci. Le fait de pouvoir reproduire ces zones en quantité importante, grâce à la synthèse peptidique par voie chimique, a ouvert de nombreuses perspectives, tout particulièrement en immunologie, en permettant le développement de réponses immunes de type humorale ou à médiation cellulaire (T auxiliaire et T cytotoxique). De plus, la synthèse peptidique permet d'introduire dans les peptides d'autres constituants que les 20 acides aminés traditionnels, afin de lui conférer de nouvelles propriétés biologiques.

J'ai choisi de compléter mes compétences de structuraliste en protéine dans ce domaine en effectuant un stage post-doctoral à L'Institut Pasteur de Lille sur une thématique vaccinale anti-VIH. J'ai réalisé la synthèse et la purification de plusieurs peptides choisis parmi la glycoprotéine gp120 du VIH et les glycoprotéines GAG et NEF du virus simien de l'immunodéficience acquise, sur lesquels nous avions introduit un motif lipidique pour induire une réponse cellulaire T cytotoxique.

Même restreintes à une petite séquence en acides aminés, les propriétés biologiques d'une protéine peuvent être modulées par des groupements prosthétiques comme le phosphate ou des chaînes oligosaccharidiques. Lors de ma thèse de doctorat, j'avais eu l'opportunité de m'intéresser à la phosphorylation des protéines en localisant les sites de phosphorylation au sein de la protéine de transition 1 isolée du testicule de bélier et au sein des protamines HP1 et HP2 isolées du sperme humain. L'ensemble de ces compétences m'a permis d'être recruté à l'UMR 8576 du CNRS, en 1994, sur un poste de maître de conférences dans le vaste domaine de la glycobiologie. J'ai effectué mes premiers pas dans la glycobiologie en déterminant la structure primaire des différentes chaînes glycanniques arborées par des glycoprotéines recombinantes produites dans différents modèles cellulaires. Il m'est apparu nécessaire, voire indispensable, de doubler mon nouveau savoir-faire structural d'une compétence dans la biosynthèse des glycannes afin de comprendre les changements structuraux observés. Pour cela, j'ai rejoint le groupe du Pr R.Cacan. Après 4 ans d'une collaboration fructueuse, j'ai

rejoint, dans le cadre du dernier plan quadriennal de l'unité, le groupe de recherche « glycobiologie de la signalisation cellulaire » dirigé par Jean Claude Michalski et en particulier le sous-groupe intitulé « glycopathologie » animé par le Dr W.Morelle, dont le but est la mise au point de méthodologies, essentiellement basées sur la spectrométrie de masse, visant à caractériser les changements de glycosylation intervenant lors de pathologies de la glycosylation innées (CDG) ou acquises.

En postulant à cette HDR, je souhaite poursuivre mon activité de recherche en développant un nouvel axe d'investigations intitulé « Comparaison du potentiel de glycosylation de fibroblastes humains sains versus fibroblastes humains atteints d'une mucopolysaccharidose de type I (MPS-I) ». Les mécanismes physiopathologiques de ces maladies sont encore très mal connus et l'objectif de notre travail est de mettre en évidence des perturbations dans la glycosylation des glycoprotéines au cours de celles-ci. Si tel est le cas, une seconde phase de notre recherche concernera l'étude de l'implication de ces changements dans les différents désordres observés chez les patients atteints de cette pathologie.

Je développerai successivement mes activités de recherche effectuées au cours de ma thèse de doctorat, de mon stage post-doctoral et depuis ma nomination de Maître de Conférences à l'UMR 8576 du CNRS. Pour cette dernière, je relaterai mes travaux concernant la biosynthèse des N-glycannes, la caractérisation de la glycosylation des glycoprotéines recombinantes, et la mise au point de méthodologies structurales pour la caractérisation des changements de glycosylation, observés au cours de certaines pathologies. Enfin, je développerai notre projet de recherches.

Travaux de recherches

en thèse

I- Généralités

La spermatogénèse est le processus biologique qui conduit à la formation des spermatozoïdes (cellules à n chromosomes) à partir des spermatogonies (cellules à 2n chromosomes). Ce processus se déroule dans les testicules au niveau des tubes séminifères. La maturation des spermatogonies progresse de façon centripète, depuis la périphérie vers la lumière des tubes où sont libérés les spermatozoïdes.

Les spermatogonies subissent tout d'abord quelques divisions mitotiques pour conduire aux spermatocytes primaires (cette phase dure environ 16 jours). C'est à ce stade cellulaire que la première division méiotique va se produire. Chaque spermatocyte primaire conduit à 2 spermatocytes secondaires. Cette phase dure 24 jours et correspond quasiment à la durée de la prophase. Les spermatocytes II entrent immédiatement dans la 2^{ème} division méiotique pour donner 2 spermatides chacun (durée 5 heures). En résumé, à l'issue de la méiose, un spermatocyte I diploïde à 2n chromosomes génère 4 spermatides haploïdes à n chromosomes. La transformation des spermatides en spermatozoïdes s'effectue au cours d'un processus complexe nommé spermiogénèse qui dure environ 24 jours.

Au cours de ce processus de prolifération, maturation et différenciation, on assiste chez les mammifères à de profonds remaniements de la chromatine, tant du point de vue morphologique et fonctionnel que biochimique. La figure 1 illustre ces différents changements tels qu'ils sont observés au cours de la spermatogénèse du bélier Ovis aries qui nous a servi de modèle d'études pour notre thèse. La chromatine apparaît diffuse dans les premiers stades de la spermatogénèse, jusqu'au milieu de la spermiogénèse. Cette chromatine diffuse, transcriptionnellement active, est alors composée d'ADN enroulé très régulièrement autour d'une structure protéique octamérique, constituée de 2 molécules de chacune des histones H2A, d'H2B, d'H3 et d'H4 (Eickbush et Moudrianakis 1978). Les histones H2A s'associent avec les histones H2B et les histones H3 avec les histones H4, pour conduire à la configuration présentée dans la figure 2. Même si les histones se différencient assez nettement l'une de l'autre, on peut toutefois dire qu'il s'agit de petites protéines d'environ 130 acides aminés (de 102 pour l'histone H4 à 220 pour l'histone H1) renfermant environ 25% d'acides aminés basiques, lysine et arginine. Ce caractère basique marqué leur confère un caractère poly-cationique apte à interagir avec la fibre d'ADN poly-anionique, via des interactions essentiellement électrostatiques. La fibre d'ADN (environ 200 paires de bases) s'enroule en effectuant presque 2 tours autour de ce noyau octomérique (Fig. 2). L'histone H1 s'intercale

Division	méiotique I	ļ	Division r	néiotique II		
spermatogonie	Spermatocyte I	Spermatocyte II		Spermatide	Spermatozoïde	
0	8		0			
Chromatine diffuse			e condensée			compacte
	HISTO	DNES				
			PROTEINES D			
						PROTAMINES

Figure 1: Changements morphologiques, ultra structuraux et biochimiques de la spermatogenèse du bélier (*Ovis aries*). Après la division méiotique II, les spermatides jeunes de forme ronde, s'allongent progressivement jusqu'au stade spermatozoïde. Parallèlement à cet allongement, on assiste à une première compaction de la chromatine qui passe d'un état diffus à un état condensé. Cette compaction est corrélée au remplacement des histones par des protéines intermédiaires. Au stade spermatozoïde, la chromatine va subir une seconde condensation qui conduit à une structure compacte. Cette seconde condensation a également été corrélée aux remplacements des protéines intermédiaires par les protamines. Au fur et à mesure de ces transitions protéiques, les protéines deviennent plus petites, plus basiques avec une augmentation du taux de résidus d'Arg et plus riches en résidus de Cys qui formeront des ponts disulfures intra et inter chaînes.



Figure 2: (a) structure du nucléosome qui est composé d'un octamère protéique constitué de 2 molécules d'histone H2A (boules bleues), 2 d'H2B (boules vertes), 2d'H3 (boules roses) et 2 d'H4 (boules jaunes). Les histones H2A interagissent via des interactions hydrophobes avec les histones H2B, de même les histones H3 avec les histones H4. Les dimères H2A/H2B interagissent avec les dimères H3/H4 par des liaisons hydrogènes. (b) La fibre d'ADN s'enroule autour du nucléosome sur presque 2 tours : la fibre « entrante» et la fibre « sortante» de l'ADN sont maintenues entre elles grâce à une molécule d'histone H1. La longueur de la fibre d'ADN en interaction avec l'octamère d'histones est de 146 paires de bases, 165 si l'on y ajoute l'histone H1. La présence de l'histone H1 conduit à une fibre chromatinienne en zigzag selon Wookcock *et al.* (1984).

entre le brin d'ADN «entrant » et le brin d'ADN « sortant » pour « verrouiller » l'ensemble (Allan *et al.* 1980, Woodcock et al. 1984)

Lorsque la spermatide commence à s'allonger, on assiste à une première condensation de la chromatine qui s'accompagne d'un remplacement de toutes les histones par une ou plusieurs protéines, nommées protéines intermédiaires ou protéines de transition (TP pour transition protein) (Loir *et al.* 1985, Loir et Lanneau 1984). Comparées aux histones, ces protéines ont une taille inférieure (environ 100AA) et sont encore plus basiques (environ 30%) avec un ratio Lys/Arg proche de 1. Rappelons que l'Arg présente un caractère plus basique que la Lys. Une autre caractéristique structurale des ces protéines est leur taux de résidus hydroxylés (Ser et Thr), plus marqué que dans les histones.

Dans les derniers stades de la spermiogénèse, on assiste à une nouvelle condensation de la chromatine qui apparaît alors compacte et, d'un point de vue fonctionnel, transcriptionnellement (ce mot n'existe pas !) inactive. En parallèle, les protéines de transition sont totalement remplacées par une ou deux protamines (sauf chez l'homme). Ces protamines sont de petites protéines (environ 50AA) très basiques puisqu'elles renferment jusqu'à 50% d'AA basiques, presque exclusivement représentés par la seule Arg. L'autre fait structural marquant de ces protéines est leur richesse en Cys (15%) qui établissent des ponts disulfures inter et intramoléculaires. Ces ponts disulfures s'établissent lors du transport épididymaire des spermatozoïdes.

II- Etude de la spermiogénèse du bélier Ovis aries

A notre arrivée dans le laboratoire, quatre protéines de transition avaient été caractérisées chez le bélier *Ovis aries* par Dupressoir *et al.* (1985) et nommées respectivement protéine P1, 3, 7 et T.

La comparaison de la composition en acides aminés des protéines de transition, isolées du testicule de bélier avec celles des autres protéines de transition isolées à partir des testicules d'autres mammifères, a montré que la protéine T du bélier appartenait à la famille des protéines de transition de type TP1 et que la protéine P1 de bélier appartenait à la famille des protéines de transition de type TP2 . Quant à la protéine 3 de bélier, elle ne présente aucune similitude de composition en acides aminés avec la protéine TP3 décrite chez le rat (Grimes *et al.* 1985). Enfin, aucune étude structurale valable n'avait pu être entreprise à partir de la protéine 7 car celle-ci était trop fortement contaminée par la forme diphosphorylée de la protéine T.

Nos travaux, au cours de notre thèse, ont permis l'établissement de la structure primaire complète de la protéine TP1. Nos efforts pour établir celle de la protéine 3 n'ont pu être couronnés de succès, faute de disposer d'une quantité suffisante de cette protéine.

II-1 Etude de la protéine de transition TP1 de bélier

A l'époque où nous avons effectué ces travaux, la seule structure primaire de protéine TP1 à avoir été établie par séquençage récurrent d'Edman était celle isolée du testicule de rat (Kistler *et al.* 1975). Quatre autres structures primaires de protéines TP1 étaient également connues mais toutes avaient été déduites de la séquence nucléotidique des gènes correspondants.

Concernant la caractérisation des modifications post-traductionnelles pouvant affecter ces protéines, en particulier la phosphorylation, toutes les études s'étaient limitées à les signaler, sans en établir la localisation précise.

Les objectifs de notre travail étaient d'une part, établir la structure primaire de la protéine TP1 de bélier par séquençage récurrent d'Edman et d'autre part, identifier précisément le ou les site(s) de phosphorylation à partir de la forme monophosphorylée que nous avions purifiée.

Nos résultats ont permis de montrer que la protéine TP1 isolée du testicule de bélier présentait de grandes similitudes structurales avec les autres protéines TP1 de mammifères (homme, rat, souris, taureau et verrat).

Par ailleurs, l'utilisation de la spectrométrie de masse de type FAB-MS et PDMS pour la mesure de la masse moléculaire de peptides provenant d'un hydrolysat de la protéine par la thermolysine et de type ESI-MS pour la mesure de la masse moléculaire de la protéine entière, nous a permis de confirmer la structure primaire établie et de mettre en évidence, pour la première fois, l'existence de 2 variants structuraux de la protéine TP1 dans le testicule de bélier.

Enfin, nos travaux ont permis pour la première fois également, d'identifier les sites de phosphorylation d'une protéine de transition. C'est ainsi que les résidus de sérine aux positions 8, 35, 36 et 39 sont apparus partiellement phosphorylés, dans la forme monophosphorylée de la protéine TP1 isolée du testicule de bélier, avec toutefois une préférence pour les sites 35 et 36, tous deux présents dans la séquence consensus Basique-X-Ser/Thr reconnue par la protéine kinase dépendante de l'AMP-cyclique.

Les résultats de ces travaux sont présentés dans la publication intitulée :

"Nuclear transition protein 1 from ram elongating spermatids. Mass spectrometric characterization, primary structure and phosphorylation sites of two variants", (1991) Chirat F., Martinage A., Briand G., Kouach M., Van Dorsselaer A., Loir M., Sautiere P. Eur J Biochem., 198, 13-20. II-2 Etude de la structure primaire de la protéine 3 de bélier.

La composition en acides aminés de la protéine 3 de bélier que nous avons établie ne montre aucune similitude avec les protéines TP2 et TP3 de rat (Cole et Kistler 1987, Luerssen *et al.* 1989, Grimes *et al.* 1977).

Le séquençage automatique d'Edman à partir de la protéine S-carboxamidométhylée entière nous a permis de déterminer, sans ambiguïté, la séquence des 27 premiers acides aminés (Fig. 3). Pour accéder au reste de la séquence, nous avons soumis la protéine 3 à l'action de l'endo-protéinase Lys-C qui coupe très spécifiquement les liaisons Lys-X, pourvu que X soit différent de Pro, ainsi qu'à la pepsine en raison du très faible taux d'acides aminés aromatiques dans la protéine.

Après fractionnement HPLC des peptides obtenus par ces 2 coupures enzymatiques (désignés par la lettre K pour les peptides endo-Lys-C et P pour les peptides pepsiques) et leur séquençage, nous avons réussi à obtenir la séquence de 86 résidus des 106 ou 107 acides aminés que compte la protéine 3 (Fig. 3). Faute de matériel protéique suffisant, nous n'avons pu obtenir la séquence complète de cette protéine à l'issue de notre thèse. Néanmoins, P. Chevaillier, avec qui le laboratoire avait établi une collaboration dans le cadre de l'étude des protéines basiques isolées des spermatozoïdes humains, a utilisé les données structurales que nous avions obtenues sur la protéine 3 pour en isoler le gène et en déduire la séquence en acides aminés complète (Fig. 3).

Parmi les principales caractéristiques structurales de la protéine 3 de bélier, citons :

- une distribution relativement homogène des acides aminés basiques tout au long du squelette peptidique,

 la présence de 8 des 13 résidus de sérine et thréonine dans des séquences constituant des motifs de phosphorylation par les protéines kinases dépendantes de l'AMP cyclique ou du GMP cyclique ou par les protéines kinase C, comme cela a été observé pour les protéines de transition TP3 et TP4 de porc (Akama *et al.* 1994, 1995).

- la présence des résidus de Tyr 33 et 93 dans une région basique renfermant également un résidu de sérine phosphorylable. En 1987, Singh et Rao avaient mentionné que le noyau phénolique de la tyrosine, présente dans la protéine TP1 de rat, s'intercalait entre les bases de l'ADN pour le déstabiliser. Concernant la protéine TP1 de bélier, nous avions mis en évidence l'existence de telles caractéristiques structurales (Chirat *et al.* 1991) et avions postulé que la phosphorylation d'un résidu de Ser à proximité pouvait permettre, dans un premier temps, la mise en place correcte de la protéine sur l'ADN et que la déphosphorylation

GCT	AAG	GGA	ACC	AGG	AAG	CCA	CGG	cag	CCA	AGA	AGA	GTT	GCA	GTG
A	K	G	T	R	K	P	R	Q	P	R	R	V	A	V
CGG R	TTT F	GCT A	TCG S	AGG R	ATG M	AAA K	GGA G	AGA R	AAG K	AAG K	ACC T	CTT L	TGG W	Q CAA Q
CGG	AGA	TAC	AGA	GGC	AGC	GTG	AAG	GCA	CCA	AAT	ATG	ACC	ATG	AGG
R	R	Y	R	G	S	V	K	A	P	N	M	T	M	R
GTC	AGA	AGA	CCT	CTA	AAA	GGA	ACC	TTG	AGA	AAG	AAA	ATC	CGA	TCG
V	R	R	P	L	K	G	W	L	R	K	K	I	R	S
TAC	GCC	ACT	CCG	TCG	AAG	AAG	GTG	AAG	AAC	ACA	AGA	GAA	CCA	AAC
Y	A	T	P	S	K	K	V	K	N	T	R	E	P	N
TGT	TTT	CTC	CGT	TCC	TGT	GCA	CGT	GAG	AAA	CTG	AAC	CAA	AGC	CGA
C	F	L	R	S	C	A	R	E	K	L	N	Q	S	R
AAA K	AGG R	TAC Y	CAA Q	95 AAT N	ATG M	CGT R	CAG Q	AGT S	OCAA Q	AGA R	AGG R	GGG G	CAG Q	¹⁰⁵ AAT N
CAA Q	AAG K	AGA R	AGA R	110 TAA										

Figure 3 : Séquence nucléotidique de l'ADNc de la protéine 3 de bélier et la séquence déduite en acides aminés.

() Structure primaire partielle de la protéine 3 S-carboxamidométhylée obtenue par séquençage automatique d'Edman.

(**E**) Séquençage automatique du peptide pepsique P1.

() Séquençage automatique du peptide pepsique P2.

(**b**) Séquençage automatique du peptide pepsique P3.

(E) Séquençage automatique du peptide endoprotéinase Lys-C K1.

() Séquençage automatique du peptide endoprotéinase Lys-C K2.

ultérieure permettait au contraire un rapprochement du segment peptidique concerné et une intercalation du noyau phénolique de la Tyr. En dépit du fait que nous n'avions aucune preuve que ces résidus de Ser et Thr soient phosphorylés dans la protéine 3 de bélier, il était néanmoins tentant de faire un parallèle.

Nous avons ensuite comparé la structure primaire de la protéine 3 de bélier avec celle de la protéine TP3 et de la protéine TP4 de porc. Au regard de certains critères, comme le taux de résidus basiques (Lys et Arg) et de leur distribution tout le long de l'axe peptidique, la protéine 3 de bélier apparaît plus proche de la protéine TP3 de porc. A l'inverse, au regard des taux de résidus amidés (Gln et Asn) et hydroxylés (Ser et Thr), la protéine 3 de bélier est plus proche de la protéine TP4 de porc. Nous avons donc proposé, qu'en plus des protéines de transition TP1 et TP2 qui apparaissent très similaires entre elles, il y avait une troisième famille de protéines de transition chez les mammifères auxquelles appartiendraient les protéines TP3 et TP4 et donc, la protéine 3 de bélier, dont nous avions établi la structure primaire.

Ces travaux ont fait l'objet de la publication suivante :

"The amino acid sequence of the ram spermatidal protein 3-a transition protein TP3 or TP4?", (1998) Chevaillier P., Chirat F., Sautière P. Eur. J. Biochem., 258, 460-464.

III- Conclusion générale

A notre arrivée au laboratoire, la structure primaire de 5 protéines de transition de type TP1 avait été élucidée et parmi ces 5 structures primaires, seule celle isolée des spermatides de rat avait été obtenue par le séquençage récurrent de Edman. Cette technique présente l'avantage, sur l'approche génétique, de travailler directement sur la protéine et donc de pouvoir identifier et localiser les modifications post-traductionnelles qu'elle peut subir. C'est la raison pour laquelle notre laboratoire de thèse, reconnu internationalement pour ses savoirfaire dans la détermination de la structure primaire des protéines nucléaires basiques et l'identification des acides aminés modifiés, m'avait confié le sujet dont je vous ai présenté les résultats dans les pages précédentes.

La compréhension d'un phénomène biologique passe obligatoirement par la caractérisation structurale fine des différentes molécules impliquées. A ce jour, les structures

primaires des protéines basiques qui interviennent dans la compaction progressive de la chromatine, au cours de la spermatogénèse des mammifères, sont connues. Pour autant, les mécanismes intimes qui conduisent à cette compaction restent très largement méconnus.

C'est ainsi par exemple que la séquence des événements de remplacement des histones par les protéines de transition et de ces dernières par les protamines fait encore l'objet de controverses. Alors qu'il semblait que ces transitions se faisaient les unes après les autres (ex : élimination des histones puis mise en place des protéines TP), il apparaît en fait qu'il y a un recouvrement des différentes familles de protéines lors de ces transitions protéiques (Zhao *et al.*, 2004). Pour étudier le rôle respectif des 2 protéines de transition majeures TP1 et TP2, des souris déficientes pour l'une ou l'autre de ces 2 protéines ont révélé que l'absence de l'une d'entre elles n'avait pas d'effet majeur sur les spermatozoïdes, que ce soit en terme de morphologie (y compris la structure de la chromatine) ou en terme fonctionnel comme la fertilité. Pour ces raisons, il a été postulé que ces 2 protéines TP1 et 2 conduit à une infertilité. (Shirley *et al.* 2004 ; Meistrich *et al.* 2003).

L'application de toutes ces connaissances pour la compréhension de certaines causes d'infertilité chez l'homme apparaît encore très lointaine, d'autant plus que la spermatogénèse humaine est beaucoup plus complexe que celle des mammifères étudiés à ce jour, ne serait-ce qu'au regard du contenu en protéines basiques dans les spermatozoïdes matures où sont encore présentes des histones, des protéines de transition (qui sont en fait des précurseurs de protamines) et plusieurs protamines (Sautière *et al.* 1988).

Travaux de recherches

Postdoctorales

Après avoir effectué ma thèse de doctorat à l'URA 409 du CNRS, j'ai rejoint l'unité CNRS N° 1309 dirigée par le Pr A. TARTAR dans le cadre d'un stage postdoctoral financé par l'Agence Nationale de Recherche sur le SIDA (ANRS) sur le thème « synthèse de peptides et pseudopeptides à visée vaccinale anti-VIH ». Ce stage a été pour moi l'occasion de m'initier à la synthèse peptidique. Celle-ci est particulièrement intéressante, car elle permet d'accéder, par voie synthétique, à la zone d'une protéine possédant une activité biologique particulière (immunologique, enzymatique, hormonale...). Outre le fait d'obtenir des quantités importantes d'un peptide pour l'étude de son activité biologique, cette technique permet également d'introduire certaines modifications dans le peptide (acides aminés exotiques, acides aminés de la série D, liaisons pseudopeptidiques) afin d'altérer ses propriétés ou de lui en conférer de nouvelles.

I- Généralités sur la réponse Cellulaire T Cytotoxique

Il existe essentiellement 3 grands types de réponses immunitaires : la réponse humorale, la réponse de type muqueuse et la réponse à médiation cellulaire. Cette dernière fait intervenir 2 grandes populations lymphocytaires différentes : les lymphocytes T auxiliaires, notés T_h pour T helper, qui expriment à leur surface le marqueur CD4 et les lymphocytes T cytotoxiques, notés T_c qui expriment à leur surface le marqueur CD8 et sont responsables de la réponse cellulaire T cytotoxique, notée réponse CTL. D'une façon très simplifiée, la vocation du système immunitaire est de garantir l'intégrité d'un organisme en éliminant systématiquement tout élément reconnu comme étranger. Cela implique que ce système doit en permanence faire la distinction entre le « soi » et le « non soi ». Pour ce faire, 2 voies parallèles ont été élaborées. La première, dite exogène, s'exerce vis-à-vis de molécules d'origine extérieure alors que la seconde, dite endogène, s'exerce vis-à-vis de molécules synthétisées par les cellules.

Pour la voie exogène, la molécule qui se trouve dans le milieu extracellulaire va être endocytée ou phagocytée. La vésicule d'endocytose ou de phagocytose formée fusionnera à terme avec un lysosome (voir page 62) pour y être dégradée. Alors qu'ils sont en cours de dégradation, certains peptides s'associeront avec des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de type II (CMH-II) présentes dans les lysosomes. Une fois associé, le complexe CMH-II/peptide est présenté à la surface cellulaire où il pourra faire l'objet d'une reconnaissance avec un lymphocyte T_H ou un lymphocyte B.

Pour la voie endogène, lorsqu'une cellule saine fabrique des protéines, une fraction des protéines nouvellement synthétisées ou mal conformées est ubiquitinylée dans le cytosol et dégradée par le protéasome en peptides (Fig. 4). Une partie de ces peptides sera acheminée dans le lysosome pour y être dégradée en acides aminés libres tandis qu'une autre partie sera acheminée dans le réticulum endoplasmique, grâce à des transporteurs de peptides nommés TAP pour « Transporter Associated with antigen Processing ». Une fois dans le réticulum endoplasmique, ces peptides vont s'associer aux protéines du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I) et le complexe CMH-I/peptide sera présenté à la surface de la cellule pour y être reconnu par les lymphocytes T_c (il s'agit d'une double reconnaissance CMH-I, d'une part, et peptide associé au CMH-I, d'autre part. Signalons que lors d'une greffe non compatible, la molécule CMH-I du greffon est reconnue comme étrangère à l'organisme par les lymphocytes T_C et il y a dégradation immédiate de la cellule présentatrice. Dans le cas d'une cellule infectée par un virus, les peptides d'origine virale sont soumis à la même procédure ; une fois arrivés à la surface cellulaire, associés à une molécule CMH-I, les lymphocytes T_C ne les reconnaitront pas comme des molécules du « soi » et la cellule présentatrice sera détruite comme précédemment.

Dans ce très bref descriptif de la réponse immunitaire, il apparaît impossible d'avoir accès à la voie endogène, c'est-à-dire de développer une réponse CTL, en utilisant une protéine immunogénique administrée depuis l'extérieur.

La mise en évidence par différents auteurs (Deres *et al.* 1989, Shield *et al.* 1991a et b) de la possibilité d'induire une réponse immune de type cellulaire T cytotoxique (CTL) au moyen de peptides synthétiques, sur lesquels un motif lipidique avait été préalablement greffé, a ouvert des perspectives vaccinales nouvelles, en particulier dans le cadre de la lutte contre le SIDA. Il faut souligner que ce type de réponse est habituellement induit par des peptides issus de la dégradation de protéines endogènes. Il est possible que l'addition d'un motif lipidique sur un peptide exogène lui permette d'accéder à une voie métabolique conduisant à cette réponse.

II- Principaux résultats

II-1 Etude de la réponse cellulaire T cytotoxique induite par les lipopeptides

Le motif lipidique utilisé par Deres *et al.* est un adjuvant de la réponse immune : le tripalmitoyl-S-glycéryl-cystéinyl-séryl-sérine (P3CSS) (Fig.5). Cette structure



Figure 4 : La réponse cellulaire T cytotoxique (CTL).

Une partie des protéines néo synthétisées (1), ou mal conformées en provenance du réticulum endoplasmique (2), est ubiquitinylée (3) et dégradée par le protéasome (4). Certains des peptides générés repassent dans le réticulum endoplasmique (5) par des transporteurs TAP et s'associent avec une molécule de CMH-I (6) avant de quitter le réticulum endoplasmique pour rejoindre l'appareil de Golgi (7) qu'ils vont traverser(8). La vésicule golgienne fusionne avec la membrane cytoplasmique et le complexe CMH-I/peptide est exposé à l'extérieur pour faire l'objet d'une reconnaissance avec un lymphocyte T cytotoxique (CD8+). Si la molécule de CMH-I, ou le peptide associé, n'est pas reconnu comme molécule du « soi », la cellule présentatrice est détruite.

No : noyau ; RE : réticulum Endoplasmique ; Pr : protéasome ; Ri : ribosome ; Go : appareil de golgi.


particulièrement difficile à synthétiser possède des propriétés mitogènes susceptibles de provoquer certains effets secondaires. Pour notre part, nous avons émis l'hypothèse que l'obtention d'une réponse immune de type cellulaire T cytotoxique par addition d'un motif lipidique à un peptide était davantage liée aux propriétés physicochimiques de ce motif lipidique qu'à une propriété biologique particulière de celui-ci.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons synthétisé les lipopeptides présentés dans la figure 6. Ces peptides ont été modifiés par l'acide amino-2-héxadécanoïde (HDA), acide aminé exotique pseudolipidique (Fig. 5). Ce motif lipidique a été introduit soit à l'extrémité C-terminale des peptides soit aux 2 extrémités N et C terminales. La réponse immune de type cellulaire T cytotoxique a été étudiée chez la souris en collaboration avec l'unité INSERM N° 152, dirigée par le Pr JP LEVY. Parallèlement à cette étude, nous avons mesuré le taux d'anticorps spécifique produit après chaque immunisation de souris avec les différents lipopeptides.

L'ensemble des résultats obtenus nous a permis de conclure que :

- des motifs lipidiques structurellement simples et dénués de propriétés mitogènes pouvaient conférer à des peptides synthétiques la capacité d'induire une réponse cellulaire T cytotoxique précoce, spécifique du virus concerné,

- le motif lipidique devait être greffé préférentiellement à l'extrémité C-terminale des peptides pour donner naissance à ce type de réponse,

- cette approche semble généralisable à d'autres épitopes T choisis parmi différents modèles viraux,

- les taux d'anticorps obtenus avec ces lipopeptides étaient beaucoup plus faibles que ceux obtenus avec les peptides seuls injectés à l'animal en présence d'adjuvant de Freund.

Ces travaux ont fait l'objet de la publication :

"Immunization of mice with lipopeptides bypasses the prerequisite for adjuvant. Immune response of BALB/c mice to human immunodeficiency virus envelope glycoprotein", (1992), Martinon F., Gras-Masse H., Boutillon C., <u>Chirat F</u>, Deprez B., Guillet J.G., Gomard E., Tartar A., Levy J.P. J. Immunol. **149**, pp 3416-3422.



Figure 5: (a) Structure chimique du tri palmitoyl-S-Glycéryl-Cystéinyl-Séryl-Sérine utilisé par le groupe de Deres *et al.* (1989) pour induire une réponse CTL. (b) Structure chimique de l'acide 2-amino héxadécanoïque que nous avons greffé à des peptides pour induire une réponse CTL.

Peptide 302-336 : (H)TRPNNNTRKSIRIQRGPGRAFVTIGKIGNMRQAHC-HDA(OH) Peptide 302-336 : (H)HDA-TRPNNNTRKSIRIQRGPGRAFVTIGKIGNMRQAHC-HDA(OH) Peptide 312-327 : (H)IRIQRGPGRAFVTIGK-HDA(OH) Peptide 312-327 : (H)HDA-IRIQRGPGRAFVTIGK-HDA(OH) Peptide NP 147-157 : (H)TYQRTRALVTG-HDA(OH) Peptide NP 147-157 : (H)HDA-TYQRTRALVTG-HDA(OH)

Figure 6 : Lipopeptides synthétisés pour l'étude de la réponse cellulaire T cytotoxique. Les 4 premiers peptides appartiennent à la protéine gp120 d'une souche virale VIH. Les 2 peptides NP appartiennent à la nucléoprotéine du virus de l'influenza. HDA : acide 2-amino hexadécanoïque.

II-2 Etude de la réponse cellulaire T cytotoxique induite par les lipopeptides chez le macaque *Macaca mulatta*

Après avoir démontré qu'il était possible d'obtenir une réponse immune de type cellulaire T cytotoxique à partir de différents lipopeptides chez la souris, toujours en collaboration avec l'équipe du Professeur JP Levy (Isabelle Bourgault), nous avons voulu savoir si une telle réponse pouvait également être obtenue chez le macaque à partir de peptides choisis parmi des protéines d'une souche du virus simien de l'immunodéficience (VIS). Dans le contexte particulier du SIDA, quand les anticorps anti-VIH perdent leur pouvoir neutralisant ou bloquent simplement l'entrée du virus dans la cellule saine sans inhiber la fusion de cellules infectées (Gp 120⁺) avec des cellules saines (CD4⁺), la cytotoxicité cellulaire T s'avère un moyen efficace pour détruire sélectivement les réservoirs de virus que sont les cellules infectées.

Pour cette étude, les protéines NEF et GAG qui sont synthétisées de façon précoce et abondante au cours du cycle viral ont été choisies. Parmi ces 2 protéines, 7 peptides ont été sélectionnés selon les critères suivants :

- 5 peptides de la protéine NEF (Fig. 7) pour leur potentialité à induire une réponse CTL ou pour leur homologie de séquence par rapport à des peptides du VIH I pour lesquelles une réponse CTL a été observée,

- le peptide 165-195 de la protéine GAG (Fig. 7) s'est révélé un épitope CTL chez le macaque,

- le peptide 246-281 de la protéine GAG (Fig. 7) qui présente la propriété d'induire une réponse CTL chez le macaque et d'être conservé dans les virus VIH I et VIH II.

Les lipopeptides correspondants ont été obtenus en leur greffant l'acide α -amino hexadécanoïque à leur extrémité C-terminale. Les 7 lipopeptides ont été injectés en mélange à 12 macaques (*Macaca mulatta*) et la réponse CTL mesurée. Les principaux résultats ont été :

- 7 macaques ont développé une réponse CTL spécifique vis-à-vis de 5 des 7 lipopeptides utilisés (NEF 125-147, 155-178, 201-225, et les 2 peptides GAG),

- la plupart de ces réponses a été obtenue après 3 injections mais certaines après 1 seule injection,

- 2 des 7 macaques présentaient encore une réponse CTL, 13 mois après la dernière injection,

- une réponse humorale spécifique a été obtenue en parallèle de la réponse CTL.

(a) Protéine NEF

Peptide 101-126

(H)Ser-Val-Arg-Pro-Lys-Val-Pro-Leu-Arg-Ala-Met-Thr-Tyr-Lys-Leu-Ala-Ile-Asp-Met-Ser-His-Phe-Ile-Kys-Glu-Lys-HDA_(OH)

Peptide 125-147

 $_{\rm (H)}$ Glu-Lys-Gly-Gly-Leu-Glu-Gly-Ile-Tyr-Tyr-Ser-Ala-Arg-Arg-His-Arg-Ile-Leu-Asp-Met-Tyr-Leu-Glu- HDA $_{\rm (OH)}$

Peptide 155-178

(H)Asp-Trp-Gln-Asp-Tyr-Thr-Ser-Gly-Pro-Gly-Ile-Arg-Tyr-Pro-Lys-Thr-Phe-Gly-Trp-Leu-Trp-Lys-Leu-Val- HDA (OH)

Peptide 201-225

 $\label{eq:hamiltonian} {}_{(\mathrm{H})} Ser-Lys-Trp-Asp-Asp-Pro-Trp-Gly-Glu-Val-Leu-Ala-Trp-Lys-Phe-Asp-Pro-Thr-Leu-Ala-Tyr-Thr-Tyr-Glu-Ala-HDA_{(OH)}$

Peptide 221-247

(b) Protéine GAG

Peptide 165-195

 $\label{eq:harder} {}_{(H)} Lys-Phe-Gly-Ala-Glu-Val-Val-Pro-Gly-Phe-Gln-Ala-Leu-Ser-Glu-Gly-Cys-Thr-Pro-Tyr-Asp-Ile-Asn-Gln-Met-Leu-Asn-Cys-Val-Gly-Asp-HDA_{(OH)}$

Peptide 246-282

 $\label{eq:Gln-Ile-Gln-Trp-Met-Tyr-Arg-Gln-Gln-Asn-Pro-Ile-Pro-Val-Gly-Asn-Ile-Tyr-Arg-Arg-Trp-Ile-Gln-Leu-Gly-Leu-Gln-Lys-Cys-Val-Arg-Met-Tyr-Asn-Pro-Thr-Asn-HDA_{\rm (OH)}$

Figure 7 : Structure primaire des différents lipopeptides synthétisés. (**a**) 5 peptides ont été choisis au sein de la protéine NEF et (**b**) 2 parmi la protéine GAG. Ces 2 protéines appartiennent au virus de l'immunodéficience simienne (VIS). L'extrémité C-terminale de chacun de ces peptides a été coiffée par une molécule lipophile d'HDA (acide 2-amino héxadécanoïque).

Cette étude a également été réalisée en collaboration avec Isabelle Bourgault de l'unité INSERM N° 152 dirigée par le Professeur JP Levy et a conduit à la publication suivante :

"Simian immunodeficiency virus as a model for vaccination against HIV. Induction in rhesus macaques of GAG- or NEF-specific cytotoxic T lymphocytes by lipopeptides", (1994) Bourgault I., Chirat F., Tartar A., Levy J.P., Guillet J.G. and Venet A. J. Immunol., **152**, 2530-2537.

Un tiré à part de cet article est présenté ci-après.

III- Conclusion générale

Le mécanisme par lequel la queue lipidique confère au lipopeptide immunogène la capacité de se retrouver dans le cytosol des cellules, où il est partiellement dégradé en un nonapeptide s'associant à une molécule de CMH-I dans le réticulum endoplasmique, reste encore mal connu (Gras-Masse 2001).

L'utilisation de lipopeptides portant différents motifs lipidiques pour le développement de réponses immunes de type CTL a été confirmée par d'autres études, que ce soit pour les virus VIH ou VIS (Seth *et al.* 2000 ; Mortara *et al.* 2000 ; Sauzet *et al.* 1995), le virus de l'hépatite B (Livingston *et al.* 1997 ; Vitiello *et al.* 1995) mais aussi pour d'autres agents pathogènes comme *Schistosoma mansoni* (Pancré *et al.* 1996) ou *Plasmodium berghei* (Verheul *et al.* 1995).

Dans le cas de la lutte contre le SIDA, la possibilité d'induire une réponse CTL est extrêmement importante car il existe une relation inverse entre l'activité CTL et la charge virale chez les patients séropositifs. Aujourd'hui encore, l'approche lipopeptidique pour éliciter une telle réponse reste une piste privilégiée (Gahery *et al.* 2005).

Le modèle macaque est le seul modèle animal permettant de tester à la fois les réponses immunes générées lors de l'injection d'immunogènes et leurs effets protecteurs après inoculation d'une souche virulente du VIS.

Ce travail a été entrepris par le groupe de recherches de l'hôpital Cochin avec lequel nous avions collaboré. Mortara *et al.* (2000) ont étudié la durée de la réponse CTL induite par les mêmes lipopeptides que nous avions synthétisés, à l'exception du motif lipidique HDA qui a été remplacé par un motif palmitoyl greffé sur la fonction ε-aminée d'un résidu de lysine en position C-terminale. Après 3 injections de ces lipopeptides aux jours J0, J21 et J42, les

macaques ont été inoculés par une souche virale VIS, 6 mois plus tard. Deux réponses CTL spécifiques vis-à-vis des lipopeptides ont été observées mais malheureusement pour une durée limitée. Le séquençage du gène codant la protéine NEF a révélé, pendant la période de l'étude, que des mutations étaient apparues et que certaines d'entre elles conduisaient à des changements dans la séquence en AA des 2 lipopeptides immunogènes. Les auteurs ont montré que ces changements modifient la reconnaissance de ces immunogènes par les lymphocytes T cytotoxiques au point d'abolir la réponse CTL.

Actuellement, des efforts pour développer des réponses CTL multi-spécifiques dirigées contre des peptides de régions fortement conservées et fonctionnellement importantes sont entrepris afin de minimiser la perte du pouvoir protecteur de ces réponses liées à la forte propension des virus HIV ou SIV à muter.

_

TRAVAUX DE RECHERCHES A L'UMR 8576 DU CNRS

A) GENERALITES

I- La N- et O-glycosylation : généralités

Parmi les nombreuses modifications que peuvent subir les protéines (environ 200) (http://en.wikipedia.org/wiki/Posttranslational_modification), la glycosylation représente la principale. On considère en effet qu'environ 50% des protéines subissent cette modification (Apweiler *et al.* 1999). Elle correspond à l'attachement covalent d'un monosaccharide ou d'une chaîne oligosaccharidique sur une chaîne protéique. Il existe essentiellement 2 grands types de glycosylation :

- la *N*-glycosylation pour laquelle la liaison entre la chaîne oligosaccharidique et la protéine s'effectue entre l'hydroxyle hémiacétalique d'un résidu de *N*-acétylglucosamine (GlcNAc) de la chaîne oligosaccharidique et l'azote du groupement amide de l'asparagine (Asn) de la protéine. Il s'agit, comme nous le verrons ultérieurement, d'une modification co-traductionnelle,

- la *O*-glycosylation pour laquelle la liaison entre la chaîne oligosaccharidique et la protéine s'effectue entre l'hydroxyle hémiacétalique du monosaccharide en position terminale réductrice de la chaîne oligosaccharidique et l'hydroxyle d'un acide aminé hydroxylé, majoritairement une sérine (Ser) ou une thréonine (Thr). Il s'agit d'une modification post-traductionnelle.

A l'inverse de la *N*-glycosylation pour laquelle la liaison entre la copule glycannique et la protéine s'établit toujours entre un résidu de GlcNAc et l'Asn, plusieurs monosaccharides (Tableau I) et acides aminés (Tableau II) sont retrouvés pour la *O*-glycosylation. Ces différences sont à l'origine des différents types de *O*-glycosylation.

Les chaînes oligosaccharidiques liées au squelette protéique sont impliquées dans de très nombreuses fonctions biologiques, tant physicochimiques que biologiques. Sans vouloir toutes les énoncer (le lecteur est invité à lire l'excellente revue de Varki parue en 1993), précisons que d'un point de vue physicochimique, elles jouent un rôle dans le maintien de la conformation des protéines, sur leur solubilité, dans le masquage de certains épitopes ou de sites de coupures par des protéases. D'un point de vue biologique, les chaînes glycanniques interviennent dans les phénomènes de reconnaissance cellule-cellule, cellule-molécule mais aussi dans l'adressage des molécules (nous y reviendrons dans le chapitre concernant notre projet de recherches) ou encore dans le contrôle de la demi-vie des glycoprotéines.

Tableau I. Les différents monosaccharides retrouvés au point d'attache de différents types deO-glycoprotéines d'après Wopereis *et al.* (2006).

Monosaccharide	Type de glycoprotéines	
GalNAc	mucine	
Xyl	protéoglycanne	
GlcNAc	nucléaires et cytoplasmiques	
Gal	collagène	
Man	α-dystroglycanne	
Glc	domaines répétés EGF (Epidermal Growth Factor)	
Fuc	domaines répétés EGF et TSR (ThromboSpondine Repeats)	

Tableau II : Les différents acides aminés pouvant être liés à des monosaccharides etoligosaccharides et types de glycoprotéines.

Acide aminé	Type de glycoprotéines	
Ser/Thr	Mucine, protéoglycanne, nucléaires et cytoplasmiques, α-dystroglycanne, domaines répétés EGF (Epidermal Growth Factor), domaines répétés EGF et TSR (ThromboSpondine Repeats)	
Hydroxy-lysine	collagène	
Tyr	glycogénine	
Hydroxy-proline	Arabinogalactane, extensines et protéines riches en proline (chez les plantes et algues)	

Depuis mon arrivée au sein de l'UMR 8576 du CNRS en septembre 1993, mes activités de recherches ont essentiellement porté sur la caractérisation structurale et l'étude des relations structure/fonction des N- et O-glycannes. Avant de présenter ces différentes activités, nous allons faire un bref rappel sur la biosynthèse des N- et O-glycannes.

II- Biosynthèse des N-glycannes.

De très nombreuses revues bibliographiques ont illustré le propos. A l'inverse de la biosynthèse de l'ADN, des ARN et des protéines qui obéit à des règles strictes, celle des *N*-glycannes s'effectue en l'absence de toute matrice moléculaire sur laquelle serait éditée les règles d'ajout séquentiel des unités monosaccharidiques. Ainsi, la synthèse d'un N-glycanne par une cellule donnée à un temps t donné dépend de nombreux facteurs. Citons :

- la disponibilité des nucléotides-sucres (UDP-Glc, UDP-Gal, UDP-Xyl, UDP-GlcNAc, UDP-GalNAc, UDP-GlcA, GDP-Man, GDP-Fuc, CMP-NeuAc),

- la présence des transporteurs de nucléosides-sucres,

- l'équipement en glycosyl-transférases et glycosidases,

- la compétition entre plusieurs glycosyl-transférases pour un même accepteur,

- la compartimentation cellulaire,

- les conditions physiologiques ou pathologiques dans lesquelles se trouvent les cellules.

Ces facteurs sont à l'origine d'une autre caractéristique de la glycosylation : à un même site de glycosylation, on trouve un nombre parfois très important de structures glycanniques. Ce phénomène est connu sous le terme de micro hétérogénéité. A titre d'exemple, Rudd et al. (1997) ont identifié plus de 100 N-glycannes différents sur l'unique site de *N*-glycosylation de la glycoprotéine érythrocytaire humaine CD 59.

La biosynthèse des N-glycannes se décompose en trois phases distinctes qui sont :

- la biosynthèse du tétradécasaccharide Glc₃-Man₉-GlcNAc₂ sur un reste lipidique le dolichol-pyrophosphate pour conduire au Glc₃-Man₉-GlcNAc₂-P-P-Dol,

- le transfert en bloc du tétradécasaccharide sur une protéine en cours de synthèse (événement co-traductionnel),

- la maturation du N-glycanne.

II-1 Biosynthèse du Glc3-Man9-GlcNAc2-P-P-Dol

L'addition des différents monosaccharides conduisant à la structure Glc₃-Man₉-GlcNAc₂ se fait de façon séquentielle sur un accepteur lipidique constitué entre 15 et 20 unités isopréniques, le dolichol-phosphate (Dol-P), qui est intégré à la membrane du réticulum endoplasmique de toutes les cellules eucaryotes (Snider et Rogers, 1984 ; Kean, 1991) et dont la structure est la suivante :

$$CH_{3} C = CH_{2} CH_$$

Ainsi, la synthèse du précurseur est strictement réticulaire, mais présente la particularité de débuter sur la face cytosolique et de s'achever sur la phase luminale (Fig.8). Il convient de préciser que l'ajout de chacun des monosaccharides est catalysé à chaque fois par à une glycosyltransférase spécifique.

II-1-1 La phase cytosolique

Le transfert des 2 premiers résidus de GlcNAc sur le Dol-P se fait à partir de l'UDP-GlcNAc. En fait, le premier résidu est ajouté sous la forme d'un GlcNAc-P avec libération d'un reste UMP, alors que le second l'est sous la forme GlcNAc avec libération d'un reste UDP. Cinq résidus de Man sont ensuite ajoutés à partir de GDP-Man pour donner l'intermédiaire Man₅-GlcNAc₂-P-P-Dol. C'est à ce stade de la biosynthèse, que ce précurseur va être basculé dans la lumière du réticulum endoplasmique grâce à une flippase nommée RFT1 qui n'a été mise en évidence qu'en 2002 (Helenius *et al.* 2002 a et b).

II-1-2 La phase luminale

La biosynthèse se poursuit par l'ajout de 4 autres résidus de Man mais non plus à partir du GDP-Man mais à partir du Dol-P-Man, synthétisé lui-même à partir du GDP-Man comme le montre la figure 8. Sur la structure Man₉-GlcNAc₂-P-P-Dol seront ajoutés 3 résidus de Glc pour donner le précurseur lipidique final Glc₃-Man₉-GlcNAc₂-P-P-Dol. Comme pour l'ajout



Figure 8 : Biosynthèse des N-glycosylprotéines.

Elle s'effectue en 2 parties distinctes au niveau du réticulum endoplasmique. La 1ère concerne la synthèse du précurseur tétra déca saccharide Glc₃Man₉GlcNAc₂ sur une molécule de dolichol. Jusqu'au stade Man₅GlcNAc₂, la synthèse s'effectue sur la face cytosolique. Au-delà, elle s'effectue dans la lumière du réticulum endoplasmique grâce à la flippase (RFT1) qui permet le « basculement » de cette structure sur la face luminale où elle sera allongée jusqu'à son terme. La seconde partie concerne quant à elle le transfert en bloc du Glc₃Man₉GlcNAc₂ sur une protéine en voie de synthèse au niveau d'une séquence consensus (Asn-Xxx-Ser/Thr avec Xxx différent de Pro). La copule glycannique est ensuite rapidement transformée en Man₉GlcNAc₂. A ce stade, la glycoprotéine nouvellement synthétisée subit un contrôle strict de la conformité de son repliement spatial (contrôle qualité) grâce au cycle gluco/dégluco dont le siège est la copule glycannique. Seules les glycoprotéines correctement conformées poursuivront leur parcours dans la voie de sécrétion, via l'appareil de Golgi. A l'entrée de ce dernier, le glycanne arboré par la glycoprotéine est généralement de type Man₈GlcNAc₂.

des Man, celui des 3 résidus de Glc se fait non pas à partir du précurseur UDP-Glc mais à partir du Dol-P-Glc.

II-2 Transfert du Glc₃-Man₉-GlcNAc₂ sur une protéine en voie de synthèse.

Le transfert du tétradécasaccharide Glc₃-Man₉-GlcNAc₂ est catalysé par un complexe enzymatique membranaire nommé l'oligosaccharyltransférase (OST) (Yan et Lennarz, 1999) dont l'organisation moléculaire fine est encore mal connue. Des études sur la spécificité de l'OST vis-à-vis du précurseur lipidique ont montré que le Glc₃-Man₉-GlcNAc₂ était le meilleur mais que des structures glycanniques tronquées de type Glc₃-Man₅-GlcNAc₂ pouvaient également être substrat de l'OST, même si l'efficacité de transfert est moindre (Helenius et Aebi, 2004). Côté protéique, on sait que tous les résidus d'asparagine d'une protéine ne seront pas forcément glycosylés. En effet, pour l'être, ce résidu d'Asn doit être présent dans une séquence consensus nommée séquon qui est une séquence tripeptidique de type Asn-X-Ser/Thr (X étant tout acide aminé excepté la proline) (Pless et Lennarz 1977 ; Hart *et al.* 1979 ; Bause 1983). Néanmoins, tous les séquons ne sont pas glycosylés ce qui signifie que d'autres critères structuraux, en particulier la conformation spatiale de la chaîne protéique sont à considérer. Enfin, un même séquon dans une glycoprotéine est souvent retrouvé sous 2 formes : non glycosylé et glycosylé. Cette hétérogénéité est nommée macro hétérogénéité.

II-3 La maturation des N-glycannes.

Une fois transféré sur le squelette d'une protéine en voie d'élongation, le N-glycanne subit très rapidement (1 à 2 min.) la perte du résidu de Glc en position terminale non réductrice grâce à l'action de la glucosidase I. La glucosidase II élimine ensuite les 2 derniers résidus de Glc de la molécule pour donner le Man₉-GlcNAc₂. La dernière étape de maturation réticulaire est le fait de la mannosidase I réticulaire qui élimine un résidu de Man pour générer l'isomère B du Man₈-GlcNAc₂. C'est à ce stade que la N-glycosylprotéine est transférée dans l'appareil de Golgi via l'ERGIC pour y subir d'autres réactions de maturation. Avant d'étudier plus précisément ces réactions, mentionnons que dans le réticulum endoplasmique, le N-glycanne sous sa forme Man₉-GlcNAc₂ et Glc-Man₉-GlcNAc₂ va être le siège d'un contrôle qualité qu'exerce la cellule pour s'assurer que les glycoprotéines nouvellement

synthétisées ont acquis leur bonne conformation spatiale. Certains de nos travaux ayant porté spécifiquement sur ce point, nous en détaillerons le mécanisme ultérieurement.

Il est actuellement clair que les différentes glycosyltransférases qui interviennent dans la maturation golgienne des glycannes ne sont pas réparties de façon homogène dans les différentes saccules golgiennes. C'est ainsi que la mannosidase I golgienne est principalement localisée dans le cis-golgi alors que la GlcNAc-Tf et la mannosidase II golgienne le sont dans le golgi médian ou encore que les Fuc-TF, Gal-Tf et sialyl-Tf le sont dans le trans-golgi et le réseau trans golgien. Néanmoins, ni les séquences signal, ni les mécanismes de localisation des glycosidases et glycosyl-Tf dans le Golgi ne sont précisément connus. De même, le transport des molécules à travers cet appareil fait encore aujourd'hui l'objet de controverse (Opat et al. 2006). Signalons à ce propos l'intérêt grandissant porté au complexe COG dont les fonctions exactes sont encore en cours d'explorations mais dont on sait qu'il est impliqué dans le transport rétrograde des protéines du Golgi (Ungar et al. 2006) indispensable au maintien de la structure et de la fonction de l'appareil de Golgi. Nous verrons dans le chapitre D, qu'une mutation affectant 3 des 8 protéines de ce complexe (Cog1, Cog 7 et Cog 8) conduit à 3 maladies de glycosylation de type II différentes (Wu et al 2004 ; Foulquier et al. 2006 2007); Kranz et al. 2007). Quoiqu'il en soit, nous pouvons considérer, de façon très schématique, que la maturation golgienne se déroule comme suit (Fig. 9).

Dans le cis Golgi, les réactions d'élagage du glycanne Man_8 -GlcNAc₂ vont se poursuivre jusqu'au Man_5 -GlcNAc₂ grâce à la mannosidase golgienne I. A défaut de l'action de cette dernière, le glycanne restera inchangé et la structure résultante sera dite de type oligomannosidique.

Dans le Golgi médian, l'action de la N-acetylglucosaminyltransférase I (GlcNAc-Tf I) va permettre de générer la structure GlcNAc(β 1-2) Man₅-GlcNAc₂ (le GlcNAc substitue le mannose α 1-3 du noyau), sur laquelle pourront agir 2 enzymes : la mannosidase golgienne de type II pour conduire à la structure intermédiaire GlcNAc(β 1-2) Man₃-GlcNAc₂ soit la GlcNAc-Tf III qui catalyse l'ajout d'un résidu de GlcNAc sur le mannose central du noyau via une liaison β 1-4 (résidu nommé GlcNAc intercalaire). Si cette enzyme agit avant la mannosidase II golgienne, cette dernière ne pourra plus agir et le glycanne résultant sera de type hybride. En effet, le Man α 1-6 restera substitué que par des Man alors que le Man α 1-3 sera substitué par une antenne N-acetyl lactosaminique. A l'inverse, dans le cas où la mannosidase II golgienne agit avant la GlcNAc-Tf III, elle permettra l'élimination des 2 résidus de Man substituant le Man α 1-6 du noyau et l'action ultérieure des autres N-



Figure 9 : Maturation des N-glycannes dans l'appareil de golgi.

Après élimination des 3 résidus de Glc et d'un résidu de mannose terminal dans le réticulum endoplasmique (formation du $Man_8GlcNAc_2$), les glycoprotéines arrivent dans l'appareil de Golgi via l'ERGIC (Endoplasmic Reticulum-Golgi Intermediate Compartment) qu'elles vont traverser depuis le compartiment cis jusqu'au compartiment trans avant d'être envoyées à la surface cellulaire ou dans le milieu extérieur via le TGN (Trans Golgi Network). Au cours de ce transit, les N-glycannes vont subir ou non l'action des enzymes suivantes:

- (1) Mannosidase I golgienne
- (2) N-acetylglucosaminyl transférase I
- (3) N-acetylglucosaminyl transférase III
- (4) Mannosidase II

- (5) N-acetylglucosaminyl transférase II
- (6) Galactosyl transférase
- (7) Sialyl transférase
- (8) Fucosyl transférase

pour devenir de type complexe (toutes les enzymes ci-dessus agissent à l'exception de l'enzyme 3) ou de type hybride (l'action de l'enzyme 3 empêche l'action des enzymes 4, 5 et 8) ou de type oligomannosidique dans le cas ou aucune de ces enzymes n'agit (à l'exception peut être de l'enzyme 1). Sur les *N*-glycannes de type complexe les monosaccharides de type périphérique comme l'acide sialique ou le fucose peuvent être ajoutés sous l'action des enzymes 7 et 8.

acetylglucosaminyl-Tf à savoir la IV, V et VI qui conduiront respectivement à des glycannes de type complexe tri, tétra et penta antennés.

Dans le trans Golgi d'autres glycosyltransférases agiront sur les *N*-glycannes de type hybride ou complexe. Il s'agit en particulier des galactosyltransférases qui conduisent aux antennes LacNAc, des sialyltransférases et des fucosyltransférases.

A l'issue de leur passage dans l'appareil de Golgi, certains *N*-glycannes auront de 1 à 5 antennes LacNAc, avec ou non 1 résidu de GlcNAc intercalaire, avec ou non un acide sialique sur les résidus de Gal terminal, avec ou non un ou plusieurs résidus de Fuc (soit sur le résidu de GlcNAc du point d'attache ou un résidu de GlcNAc d'une antenne ou encore sur un résidu de Gal). La phrase précédente, de construction grammaticale contestable, illustre l'extrême variabilité structurale que peut porter un *N*-Glycanne. C'est ainsi, comme énoncé précédemment, que l'on retrouve sur un même résidu d'Asn, un nombre parfois très important de structures glycanniques différentes.

III- Biosynthèse des O-glycannes.

Dans ses modalités, la *O*-glycosylation diffère significativement de celle des *N*-glycannes au regard de plusieurs points :

- c'est un événement post-traductionnel alors que la N-glycosylation est un événement co-traductionnel,

- elle a lieu exclusivement dans l'appareil de Golgi,

- les monosaccharides sont ajoutés sur la protéine de façon séquentielle (monosaccharide par monosaccharide) à partir des mêmes nucléosides-sucres que ceux décrits pour les *N*-glycannes, à l'exception des 2 Dol-P-ose, Glc et Man. Rappelons que les N-glycannes sont ajoutés à une protéine par le transfert en bloc du tétra déca saccharide Glc₃-Man₉-GlcNAc₂ à partir du Glc₃-Man₉-GlcNAc₂-P-P-Dol,

- alors que le résidu de GlcNAc constitue le seul monosaccharide d'attache aux protéines dans le cas des N-glycannes, plusieurs monosaccharides sont retrouvés pour les Oglycannes (Tableau I),

- plusieurs acides aminés sont le siège d'une O-glycosylation alors que seul l'Asn est le siège de la N-glycosylation (Tableau II).

Si l'on se focalise uniquement sur les O-glycannes de type mucine qui sont ceux sur lesquels certains de nos travaux ont porté, on retrouve une organisation structurale similaire aux *N*-glycannes avec un noyau, des antennes et des monosaccharides dits périphériques

(Hounsell and Feizi, 1982) à cela près que 8 noyaux O-glycanniques ont été décrits contre un seul pour les *N*-glycannes. La biosynthèse de ces noyaux est présentée dans la figure 10.

Nous verrons dans les chapitres consacrés à la caractérisation des glycannes d'une érythropoïétine et des glycannes des glycoprotéines sériques, que les O-glycannes sont de type mucine, qu'ils sont bâtis sur le noyau de type I et qu'ils sont souvent de petites tailles.



Figure 10 : Biosynthèse des noyaux O-glycanniques de type mucine.

La biosynthèse des *O*-glycannes de type mucine débute par l'ajout d'un résidu de GalNAc sur un résidu de Ser (ou Thr) d'une protéine dans l'appareil de Golgi. Cette réaction est catalysée par une UDP-GalNAc : protéine α -GalNAc-Tf. La structure formée est nommée antigène Tn. En fonction de la nature des monosaccharides qui sont ensuite ajoutés et du type de liaison, 8 noyaux différents ont été caractérisés à ce jour. Les différentes enzymes qui catalysent ces réactions sont présentées ci-dessous.

1 : core 1 (β 1-3)-Gal-Tf	2 : core 2 (β 1-6)-GlcNAc-Tf	3 : core 3 (β 1-3)-GlcNAc-Tf
4: core 4 (β 1-6)-GlcNAc-Tf	5 : core 5 (α 1-3)-GalNAc-Tf	6 : core 6 (β 1-6)-GlcNAc-Tf
6' : core 2 (β 1-3)-Gal-Tf	7 : core 7 (α 1-6)-GalNAc-Tf	8: core 8 (α1-3)-Gal-Tf

B) CARACTERISATION DE LA GLYCOSYLATION DE GLYCOPROTEINES RECOMBINANTES

I- Généralités

Il y a seulement une trentaine d'années, les molécules thérapeutiques étaient essentiellement issues de la synthèse chimique ou encore, pour les plus sophistiquées d'entre elles, extraites de leur milieu naturel (sang, plasma, pancréas etc.). Cette dernière approche est caractérisée par des rendements extrêmement faibles, des risques de transmission de virus ou du prion non négligeables et enfin des coûts élevés limitant l'utilisation à grande échelle des molécules ainsi préparées. Avec l'avènement des biotechnologies, la plupart de ces inconvénients majeurs a été reléguée au second plan et de nombreuses protéines et glycoprotéines recombinantes sont aujourd'hui utilisées, ou en passe de l'être, à des fins thérapeutiques ou diagnostiques (Sethuraman and Stadheim 2006).

S'agissant de produire des glycoprotéines humaines, les cellules de mammifères apparaissent les plus adaptées. Malheureusement, comme précédemment, les risques de contamination par des agents pathogènes tels les virus ou le prion sont loin d'être négligeables. Aussi, pour pallier cet inconvénient, plusieurs types cellulaires ont été testés afin de produire au meilleur coût et avec la plus grande efficacité thérapeutique les glycoprotéines d'intérêt. L'utilisation de bactéries a été vite abandonnée car celles-ci ne possèdent pas la machinerie de glycosylation capable de conduire aux chaînes glycanniques retrouvées sur les glycoprotéines produites par nos cellules. Des études effectuées sur différentes levures et champignons filamenteux (Gerngros 2004) ont révélé que ces cellules disposent de l'équipement enzymatique nécessaire pour glycosyler les protéines (Gemmil et al. 1999). Malheureusement, si la phase réticulaire (biosynthèse du précurseur lipidique Glc₃-Man₉-GlcNAc₂-P-P-Dol) est identique aux cellules de mammifères, la maturation des chaînes glycanniques dans l'appareil de Golgi apparaît très différente. On observe en effet une poly mannosylation (jusqu'à 100 résidus de Man) rendant ce modèle difficilement utilisable. D'autres études ont concerné l'utilisation de cellules de plantes qui présentent de nombreux avantages comme le fait de disposer de tout l'équipement enzymatique nécessaire pour réaliser les différentes modifications post-traductionnelles réalisées par les cellules de mammifères (Joshi et Lopez, 2005). Un autre atout à leur utilisation est le fait qu'elles synthétisent quantitativement beaucoup de protéines qu'elles stockent dans des compartiments particuliers (feuilles, graines, fruits...), facilitant la purification de la glycoprotéine recombinante désirée. Comme précédemment, l'étape réticulaire est identique aux cellules de mammifère mais pas celle de la maturation golgienne qui conduit à des glycannes tronqués de type paucimannose (Man₃-GlcNAc₂) porteur d'un résidu de Fuc lié en α 1-3 (au lieu de α 1-6) sur le résidu de GlcNAc du point d'attache et d'un résidu de Xyl lié en β 1-2 sur le résidu de Man central du noyau pentasaccharidique. Ces 2 substitutions du noyau constituent un problème majeur car les motifs obtenus sont immunogéniques chez l'homme. Quant aux cellules d'insectes, elles présentent un potentiel de glycosylation similaire aux cellules de plantes à l'exception de l'ajout d'un résidu de xylose sur les N-glycannes (Harrison and Jarvis 2006). Néanmoins, le problème du résidu de Fuc lié en α 1-3 sur le résidu de GlcNAc du point d'attache persiste.

Toutes les caractéristiques de glycosylation propres à ces modèles posent donc un gros problème d'utilisation chez l'homme car il est aujourd'hui très largement démontré que l'efficacité thérapeutique d'une glycoprotéine recombinante dépend beaucoup de la structure des N-glycannes qu'elle arbore (Van Patten et al. 2007) et que celle-ci, pour un type cellulaire donné, est également dépendante de nombreux facteurs (composition du milieu de culture, du mode de culture, etc.) parfois difficiles à maîtriser. Il est donc indispensable de vérifier de façon stricte que la glycosylation d'une glycoprotéine recombinante à usage thérapeutique est conforme à celle de la glycoprotéine naturelle.

Depuis notre arrivée à l'UMR 8576 du CNRS, une part importante de nos activités de recherches a été consacrée à la caractérisation structurale des glycoprotéines recombinantes produites dans des cellules de mammifères, des cellules de plantes ou des cellules d'insecte.

II- Caractérisation de la glycosylation d'érythropoïétines humaines recombinantes produites dans une lignée cellulaire de mammifère

L'érythropoïétine est une hormone de nature glycoprotéinique synthétisée majoritairement par les reins (85%) et par le foie (15%) en réponse à une hypoxie liée à la perte normale des hématies en fin de vie ou à un séjour prolongé en altitude. Les cellules cibles de l'EPO se trouvent dans les organes érythropoïétiques représentés chez l'adulte par la moelle osseuse et la rate. Elle agit sur la différentiation des cellules pluripotentes et sur la prolifération des cellules de la lignée érythrocytaire. De plus, elle accélère la libération des réticulocytes dans le sang. Du point de vue moléculaire, l'EPO est constitué d'un squelette protéique de 166 acides aminés et de 4 chaînes glycanniques dont 3 sont de type N-glycanne

(localisées sur les Asn 24, 38 et 83) et une de type O-glycanne (localisée sur le résidu de sérine 126). Lors de certaines pathologies comme l'insuffisance rénale ou les leucémies nécessitant un traitement par chimiothérapie, l'érythropoïétine recombinante est utilisée pour stimuler la production de cellules de la lignée rouge.

Dans les années 1990, le Laboratoire Français du Fractionnement et des Biotechnologies (LFB) de Lille a souhaité produire une érythropoïétine humaine recombinante (EPOhr) en utilisant une cellule humaine issue d'une lignée lymphoblastoïde afin d'obtenir une molécule présentant des caractéristiques structurales et fonctionnelles les plus proches possibles de celles isolées de l'urine. Conscient de l'influence de la composition du milieu de culture mais aussi du mode de culture sur la glycosylation, le LFB a testé 3 conditions de production différentes :

- dans un cytoculteur régulé de 240L par culture en suspension en mode discontinu dans un milieu renfermant 1% de sérum de veau fœtal (EPOhr nommée 97P16),
- dans un cytoculteur à perfusion de 20L dans le même milieu de culture que précédent (EPOhr 97P19),
- dans un cytoculteur à perfusion de 20L dans le même milieu de culture que précédent mais en absence de sérum de veau fœtal (EPOhr 97P22).

Pour chacune de ces 3 EPOhr, le LFB a souhaité que nous caractérisions de façon exhaustive la structure de leurs chaînes glycanniques ainsi que leur état de sialylation en terme quantitatif et qualitatif (nature des acides sialiques et mode liaison α 2-3 ou α 2-6).

Ce travail a été effectué dans le cadre d'une convention CIFRE entre le LFB et l'USTL et a constitué le sujet de thèse de Didier COINTE, sous la responsabilité du Professeur André VERBERT et sous la codirection scientifique du Dr D.BOUREL et de moi-même.

II-1 Stratégie d'études

Pour réaliser ce travail (schéma 1), les différentes EPOhr ont tout d'abord été réduites et alkylées avec la 4-vinyl pyridine. Dans le but d'étudier la glycosylation des 4 sites de glycosylation, les EPOhr réduites et alkylées ont ensuite été traitées par l'endoprotéinase Glu-C et les peptides et glycopeptides ont été purifiés par HPLC en phase inversée. Les différentes fractions collectées ont été analysées par spectrométrie de masse ESMS afin d'une part, de repérer et d'identifier les sites de glycosylation par séquençage d'Edman, et d'autre part, de déterminer la structure des glycannes sur chacun des sites.



Schéma 1 : Stratégie utilisée pour la caractérisation structurale d'une érythropoïétine recombinante humaine.

En parallèle, nos efforts ont porté sur l'étude de la sialylation des EPOhr afin de préciser le taux de sialylation, le taux d'acide sialique lié en α 2-3 versus α 2-6 et la nature des acides sialiques portés par celles-ci. Pour répondre aux 2 premières questions, nous avons développé la stratégie présentée dans le schéma 2 qui a fait l'objet de la publication intitulée :

"Determination of the sialylation and of the ratio $\alpha 2$ -3 / $\alpha 2$ -6 sialyl linkages of N-glycans by methylation and GC/MS analysis", (1998) Cointe D., Leroy Y. And Chirat F. Carbohydrate Research **311**, pp 51-59.

II-2 Principales conclusions

Comparée à la glycosylation de l'EPO naturelle, nos travaux ont permis de montrer que l'EPOhr produite par les cellules d'une lignée lymphoblastoïde humaine présente une grande similitude à celle recueillie dans les urines humaines (Tsuda *et al.* 1988) au regard :

- du taux de sialylation proche de 82%,

- du rapport des acides sialiques liés en α 2-6 / α 2-3 voisin de 2/1,

- de la nature des acides sialiques puisque 99,7 % sont représentés par l'acide Nacetylneuraminique,

des sites de glycosylation représentés par les résidus d'Asn aux positions 24,
38 et 83 ainsi que par le résidu de Ser en position 126,

- de la distribution des N-glycannes bi-, tri- et tétra antennés sur les 3 sites de Nglycosylation 24, 38 et 83. En effet, le site de glycosylation Asn 24 est occupé, pour 33%, par des N-glycannes de type complexe biantennés, pour 20%, par des N-glycannes tri antennés et le reste par des N-glycannes tétra antennés alors que pour les 2 autres sites les taux de Nglycannes de type tétra antennés sont respectivement de 86% et 100%,

- de la nature des O-glycannes retrouvés sur le résidu de Ser 126,

- de son activité biologique que ce soit en termes de taux de production de réticulocytes chez le lapin ou de demi-vie.

Par contre, nos résultats ont révélé des différences sensibles au regard :

- du taux de fucosylation qui apparaît plus élevé,
- de la présence d'un motif sialyl Lewis X qui corrobore le point précédent,

- de la présence quasi systématique d'un résidu de GlcNAc intercalaire par Nglycanne sur les 3 sites de N-glycosylation,

- de la présence très élevée de répétitions LacNAc en particulier sur les sites de N-glycosylation 38 et 83 où 75% des N-glycannes sont porteurs d'une telle répétition.

Enfin, l'étude comparative réalisée sur les 3 EPOhr ne met pas en lumière de différence significative sur les différents points énoncés ci-dessus. La présence ou non de sérum de veau fœtal ainsi que le mode de conduite des cultures n'altèrent pas le profil général de glycosylation des 3 EPOhr.

L'ensemble des résultats obtenus pour les 3 EPOhr est présenté dans la publication intitulée :

"Unusual N-glycosylation of a recombinant human erythropoïetin expressed in a human lymphoblastoïd cell line does not alter its biological properties", (2000) Cointe D., Béliard R., Jorieux S., Leroy Y., Glacet A., Verbert A., Bourel D. and Chirat F. Glycobiology 10, pp 511-519. III- Caractérisation de la glycosylation de la lactoferrine humaine recombinante produite dans des cellules de plantes

La lactoferrine (Lf) est une glycoprotéine de 80kDa isolée du lait et des polynucléaires neutrophiles qui présentent de très nombreuses propriétés biologiques notamment antibactériennes, antifongiques, antivirales et anti-inflammatoires (Brock 2002). Ce large spectre d'action a conduit à la produire de façon industrielle pour la complémentation de l'alimentation des enfants. Sur le plan moléculaire, elle possède 3 sites de N-glycosylation localisés sur les résidus d'Asn 138, 479 et 624. Les Asn 138 et 479 sont majoritairement occupés par des N-glycannes de type complexe bi antennés partiellement fucosylés (sur le résidu de GlcNAc du point d'attache) et sialylés (Spik *et al.* 1982). Quant au site Asn 624, il apparaît largement sous-glycosylé (Spik *et al.* 1982 ; Van Berkel *et al.* 1996).

L'objectif de ce travail était de comparer le profil de glycosylation des 3 sites de la Lfh produite dans une plante monocotylédone, le maïs (nommée Lfh recombinante dans le maïs, Lfhrm), avec celui obtenu à partir de la Lfh produite dans une plante dicotylédone, le tabac (nommée Lfh recombinante dans le tabac, Lfhrt).

III-1 Stratégie d'études

Une stratégie similaire à celle présentée précédemment pour l'EPOhr a été utilisée. Brièvement, la Lfhrm et Lfhrt purifiées à partir respectivement de l'endosperme du grain de maïs et de la feuille de tabac, ont été réduites et alkylées par l'iodoacétamide. Dans le but d'isoler les 3 sites de glycosylation, elles ont été soumises à une digestion enzymatique par la trypsine et les peptides et glycopeptides ont été purifiés par HPLC en phase inversée. L'analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF-MS des différentes fractions HPLC a permis d'isoler les glycopeptides. La caractérisation structurale du squelette peptidique et des différents N-glycannes obtenus après action de la PNGase-A a été faite par spectrométrie de masse MALDI-TOF-MS et ES-MS-MS.

III-2 Principales conclusions

Les principales conclusions obtenues de cette étude comparative sont les suivantes :

 les résidus d'Asn 138 et 479 sont N-glycosylés à la différence de l'Asn 624 pour lequel nous n'avons pu mettre en évidence des N-glycannes, - la structure des N-glycannes est de type paucimannose avec la présence de Xyl intercalaire en β 1-2 et de Fuc lié en α 1-3 au lieu de α 1-6 (Xyl-Fuc-Man₃-GlcNAc₂),

- le profil de glycosylation des 2 sites Asn 138 et Asn 479 apparaît identique,
- l'absence de motif Lewis a (Le^a).

La principale différence entre les types cellulaires est la capacité des cellules de tabac à fabriquer les structures GlcNAc-Xyl-Fuc-Man₃-GlcNAc₂ et GlcNAc₂-Xyl-Fuc-Man₃-GlcNAc₂, structures que nous n'avons pas mis en évidence dans la Lfhr produite dans le maïs. Cette différence a été attribuée à une activité N-acetylglucosaminidase plus importante dans les grains de maïs que dans les feuilles de tabac.

Ce travail a fait l'objet de l'article intitulé :

"Comparative analysis of the site-specific N-glycosylation of human lactoferrin produced in maize and tobacco plants" (2003) Samyn-Petit B., Wajda Dubos J.P., Chirat F., Coddeville B., Demaizieres G., Farrer S., Slomianny M.C., Theisen M. and Delannoy P. Eur. J. Biochem. 270, pp 3235-3242.

IV- Caractérisation de la glycosylation de la lactoferrine bovine recombinante produite dans des cellules d'insecte

D'une façon similaire à l'étude précédente, nous avons participé quelques années plus tôt à l'étude des potentialités de glycosylation des cellules d'insectes (*Mamestra brassicae*) en déterminant la structure des différents N-glycannes présents sur les différents sites de glycosylation de la lactoferrine bovine. L'étude de la glycosylation de la lactoferrine bovine isolée du lait, révèle la présence de 5 sites potentiels de N-glycosylation dont 4 sont effectivement glycosylés : l'Asn 233, 545, 476 et 368 (Coddeville *et al.* 1992). Les 2 premiers sites sont occupés par des N-glycannes de type oligomannosidique alors que le site Asn 476 est occupé par des N-glycannes de type complexe partiellement fucosylés et sialylés. Le site Asn 368 est occupé par les 2 types de N-glycannes, oligomannosidiques et complexes.

La stratégie utilisée s'apparente très fortement à celle présentée dans le cas de l'étude précédente sur la lactoferrine humaine recombinante produite dans le maïs ou le tabac.

Les principaux résultats obtenus sont les suivants :

- 3 des 4 sites de N-glycosylation ont été retrouvés (Asn 233, Asn 476 et Asn 545),

- les Asn 233 et 545 de la Lfbr sont occupés uniquement par des N-glycannes de type oligomannosidique, comme ceux de la Lfb naturelle (Fig.11),

- l'Asn 476 est occupé exclusivement par des structures glycanniques de type paucimannose partiellement fucosylées. A l'inverse des cellules de plantes, le résidu de Fuc est lié au résidu de GlcNAc du point d'attache par une liaison α 1-6, c'est-à-dire une liaison type « mammifère ». La présence de ce résidu de Fuc sur des N-glycannes Fuc-Man₃-GlcNAc₂ signifie que ces glycannes sont le résultat d'une dégradation partielle des Nglycannes produits dans les cellules d'insectes. En effet, la Fuc-Tf ne peut ajouter un résidu de Fucose sur un N-glycanne que si les GlcNAc-Tf I et II ont agi en amont.

Cette étude a permis de démontrer que les cellules d'insectes respectaient la même distribution (oligomannosidique et complexe) (Fig.11) des N-glycannes sur une glycoprotéine mais ne permettaient pas de conduire à des N-glycannes de types complexes tels que ceux que l'on trouve dans les glycoprotéines produites par des cellules de mammifères.

Ces travaux ont fait l'objet de la publication suivante :

"Microheterogeneity of the oligosaccharides carried by the recombinant bovine lactoferrin expressed in <u>Mamestra brassicae</u> cells" (1997)

Lopez, M., Coddeville B., Langridge J., Plancke Y., Sautière P., Chaabihi H., Chirat F., Harduin-Lepers A., Cerutti M., Verbert A. and Delannoy P. Glycocbiology 7, pp 635-651.

V- Conclusion générale.

Le challenge majeur dans la production d'une glycoprotéine recombinante est sans aucun doute le respect de sa glycosylation par rapport à la molécule naturelle. Ce challenge est rendu encore plus ardu par la volonté d'éviter d'utiliser, pour cette fin, des lignées cellulaires de mammifères. Dans le lent développement de cette technologie, la première étape a consisté à rechercher le modèle cellulaire le plus adéquat pour atteindre cet objectif. Comme nous l'avons mentionné dans notre chapitre d'introduction, plusieurs modèles cellulaires (levures, cellules d'insectes, cellules de plantes) ont été examinés à la loupe. Nos activités de recherches s'inscrivent essentiellement dans cette première étape d'études.

Au début du XXI^{ème}, on peut considérer que l'on est entré dans une seconde phase d'études caractérisée par une recherche visant à modifier le potentiel de glycosylation de ces cellules dans le but d'« humaniser » les N-glycannes des glycoprotéines produites que ce soit chez la levure (Pichia pastoris) en inhibant les gènes des glycosyltransférases spécifiques de







Figure 11 : Comparaison des structures N-glycanniques retrouvées sur les 3 sites de *N*-glycosylation Asn 233 (A), Asn 476 (B) et Asn 545 (C) de la lactoferrine bovine naturelle (Lfb) et de la lactoferrine bovine recombinante (Lfbr) produite chez *Mamestra brassicae*

la glycosylation « levure » et en introduisant ceux permettant d'aboutir à des N-glycannes sialylés (Hamilton *et al.* 2006), chez les plantes par inactivation de l' α 1-2 xylosyltransférase et de l' α 1-3 fucosyltransférase (Schähs *et al.* 2007) ou encore chez les cellules d'insectes pour lesquelles ont été introduites les N-acetylglucosaminyl-Tf I et II, une β 1-4 galactosyl-Tf une α 2-6 sialyl-Tf mais également les enzymes permettant la biosynthèse du CMP-NeuAc (Harrison and Jarvis 2006).

C) ETUDE DU DEVENIR DES GLYCOPROTEINES NOUVELLEMENT SYNTHETISEES

I- Introduction

Nous avons, dans le chapitre consacré à la maturation des N-glycannes dans le réticulum endoplasmique, mentionné qu'au stade Man₉-GlcNAc₂ la glycoprotéine nouvellement synthétisée allait faire l'objet d'un contrôle qualité concernant sa conformation. Ce contrôle qualité a pour but d'écarter de la voie de sécrétion les glycoprotéines dont la conformation correcte n'est pas acquise. Sans aller à la dégradation systématique de ces glycoprotéines, la cellule s'est dotée d'un système de « correction » qui fait intervenir de nombreuses protéines parmi lesquelles nous trouvons :

- l'UDP-Glc :glycoprotein glucosyltransferase (UGGT) qui reconnaît des zones hydrophobes sur une glycoprotéine mal conformée et transfert un résidu de Glc sur celle-ci à partir d'UDP-Glc (Trombetta *et al.* 1989),

- la glucosidase II, mentionnée précédemment, qui permet d'éliminer le résidu de Glc terminal sur un glycanne de structure Glc₁-Man₉-GlcNAc₂,

 la calnexine (CNX) et la calréticuline (CRT) qui sont 2 protéines chaperonnes douées de propriétés lectiniques reconnaissant spécifiquement le motif Glc₁-Man₉-GlcNAc₂ (Ware *et al.* 1995 ; Spiro *et al.* 1996),

- la GRP 78 (Glucose Regulated Protein) qui est une des nombreuses protéines chaperonnes que compte une cellule et dont la propriété est de se fixer aux protéines et glycoprotéines mal conformées pour éviter leur agrégation (Nishikawa *et al.* 2001 ; Simons *et al.* 1995),

- la PDI (Peptidyl Disulfide Isomerase) et la PPI (Peptidyl Prolyl cis-trans Isomérase) qui participent à la mise en conformation des protéines (Wang et Tsou 1998), pour ne citer que les principales. Ce contrôle qualité qui s'appuie largement sur les glycannes, confère un rôle biologique supplémentaire aux N-glycannes et ce, dès leur transfert sur une protéine (Helenius et Aebi 2001). Ces différents facteurs vont agir de façon orchestrée (Fig. 12). Ainsi, lorsque qu'une glycoprotéine est mal conformée, elle est reconnue d'une part par des protéines chaperonnes, en particulier la GRP78, et d'autre part par l'UGGT. En cas de défaillance du système, la mobilisation d'un taux important de GRP78 va déclencher la réponse UPR (Unfolded Protein Response) qui conduit, chez la levure, à l'activation de plus de 300 gènes qui codent des protéines impliquées dans le repliement des protéines et



Figure 12 : Schéma du cycle « gluco/dégluco » dans le processus de remise en conformation d'une glycoprotéine nouvellement synthétisée mal conformée.

Après la biosynthèse d'une glycoprotéine (1), les molécules incorrectement conformées vont mobiliser la protéine chaperon GRP78 qui va empêcher leur agrégation (non représenté sur le schéma). La mobilisation de la GRP 78 va déclencher la réponse UPR (Unfolded Protein Response). L'UGGT va reconnaître des zones hydrophobes sur les glycoprotéines mal conformées, s'y fixer, et transférer un résidu de Glc sur la branche α 1-3 (2). La forme monoglucosylée est alors reconnue par la calnexine (CNX, membranaire) ou la calréticuline (CRT, soluble) (3). Ainsi « immobilisées », les glycoprotéines mal conformées intéragissent avec la PDI et/ou la PPI qui vont tenter de corriger la conformation défectueuse (3). L'action de la glucosidase II (4) mettra fin à ces intéractions. Deux cas de figure sont à envisager : la glycoprotéine « relachée » est maintenant correctement repliée (5) et pourra poursuivre son chemin dans la voie de secrétion (10) après action de la mannosidase I réticulaire qui élimine le Man en position terminal non réductrice de la branche du milieu (isomère B) (9). Dans le cas contraire (6) elle subira un nouveau cycle de glucosylation par l'UGGT (2) et de déglucosylation par la glucosidase II (4). Néanmoins, au bout d'un certain nombre de cycle, l'action d'une mannosidase de classe I (7) mettra fin à ce cycle en adressant la glycoprotéine définitivement mal conformée vers le translocon qui la fera passer dans le cytosol (8) où elle rejoindra le protéasome pour être y dégradée (12). Ce processus de dégradation porte le nom d'ERAD pour Endoplasmic Reticulum Associated Degradation.

glycoprotéines, des protéines chaperons, mais également des protéines impliquées dans la dégradation (Patil et Walter 2001). De plus, on assiste à un ralentissement de la synthèse protéique. La seconde protéine qui reconnaît une glycoprotéine mal conformée est l'UGGT qui va ajouter un résidu de Glc sur un glycanne de type Man₉-GlcNAc₂ pour générer le Glc₁-Man₉-GlcNAc₂. Ce motif glycannique est alors reconnu soit par la CNX (membranaire) ou la CRT (soluble) dont le rôle est de maintenir en quelque sorte les glycoprotéines mal conformées dans le réticulum endoplasmique. Sous cette forme en interaction avec la CNX ou la CRT, les enzymes impliquées dans la mise en conformation des protéines et glycoprotéines vont pouvoir intervenir sur celles-ci dans le but de corriger le défaut. En parallèle et de façon compétitive, le glycanne Glc₁-Man₉-GlcNAc₂ peut également subir l'action de la glucosidase II dont le but est d'éliminer le résidu de Glc en position terminale non réductrice, entraînant ainsi la dissociation du complexe transitoire glycoprotéine/ CNX ou CRT. A ce stade, il faut envisager 2 cas de figure :

- ou bien la conformation de la glycoprotéine initialement mal conformée a pu être corrigée et la glycoprotéine peut alors poursuivre son cheminement et sa maturation dans la voie de sécrétion,

- ou bien la conformation de la glycoprotéine reste incorrecte et elle sera de nouveau reconnue par l'UGGT pour un nouveau cycle de mise en conformation.

Cette répétition de cycle glucosylation/déglucosylation est connue sous le terme de cycle gluco/dégluco (Verbert and Cacan, 1999).

Dans un certain nombre de cas, la mauvaise conformation adoptée par une glycoprotéine est le résultat d'une mutation génétique qui conduit, par exemple, au remplacement d'un acide aminé par un autre. Dans ce cas, la cellule n'a aucune chance de corriger la conformation défectueuse de la protéine qui en découle, et il est inutile qu'elle poursuive de façon infinie ce cycle. En parallèle de ce contrôle qualité, la cellule s'est également dotée d'un système de dégradation visant à éliminer du réticulum endoplasmique les glycoprotéines mal conformées et à les dégrader dans le cytosol par la voie du protéasome. Cette voie est nommée ERAD pour Endoplasmic Reticulum Associated Degradation (Bonifacio and Weissman 1998). La question posée par la communauté scientifique à l'époque de nos travaux et qui n'est pas totalement résolue à ce jour, était celle du signal moléculaire qui déclenche l'arrêt du cycle gluco/dégluco pour une glycoprotéine mal conformée et son envoi dans le cytosol par un mécanisme de rétro-translocation (Wiertz *et al.* 1996a et b) dans la voie de l'ERAD. Quoiqu'il en soit, une fois dans le cytosol, la glycoprotéine mal conformée est déglycosylée grâce à une PNGase cytosolique. Les oligosaccharides de type OS-gn2 libérés (ex : Man₈- GlcNAc₂) subissent très rapidement l'action de la chitobiase cytosolique (Cacan *et al.* 1996) qui coupe la liaison glycosidique entre les 2 résidus de GlcNAc à l'extrémité réductrice pour générer des oligosaccharides de type OS-gn1 (ex : Man₉-GlcNAc₁).

Nos travaux de recherches effectués de 1999 à 2003 sous la direction du Professeur R. Cacan avaient pour but d'identifier le signal moléculaire qui envoie une glycoprotéine mal conformée vers l'ERAD. Pour cela, nous avons disposé de 3 atouts majeurs pour appréhender ces études :

le marquage métabolique des N-glycannes par du mannose tritié [2-³H]-Man suivi
 de l'extraction séquentielle des oligomannosides libres, des précurseurs Dol-P-P oligosaccharidiques et des glycoprotéines,

 la caractérisation structurale par chromatographie liquide en phase normale couplée à un détecteur de radioactivité des oligomannosides, initialement libres ou après libération des Dol-P-P-oligosaccharides ou des glycoprotéines,

- la possession de différentes cellules CHO mutantes pour la glycosylation, notamment les cellules dites:

• B3F7 qui sont des cellules déficientes en Man-P-Dol synthase : elles sont donc incapables de passer de la structure Man₅GlcNAc₂-P-P-Dol à la structure Man₉-GlcNAc₂-P-P-Dol (les 4 derniers résidus de Man sont ajoutés à partir de Man-P-Dol),

• MI8-5 qui sont des cellules déficientes en Glc-P-Dol glucosyltransferase I : ces cellules sont incapables de passer de la structure Man₉GlcNAc₂-P-P-Dol à la structure Glc₃-Man₉-GlcNAc₂-P-P-Dol (le premier des 3 résidus de Glc ne peut être ajouté).

II-Principaux résultats

II-1 Relation entre l'α1-2 mannosidase réticulaire et l'UGGT

Dans le but de caractériser le signal moléculaire entraînant la dégradation d'une glycoprotéine mal conformée, nous avons utilisé comme modèle cellulaire d'étude les cellules B3F7. Ces cellules transfèrent sur leurs protéines en voie de synthèse le précurseur oligosaccharidique tronqué Glc₃-Man₅-GlcNAc₂ qui est rapidement converti en Man₅-GlcNAc₂ grâce aux glucosidases réticulaires I et II. Des études antérieures avaient montré que :

- dans ce modèle, les glycoprotéines nouvellement synthétisées séjournaient beaucoup plus longtemps dans des compartiments intracellulaires (au moins 8 h) du fait de la mauvaise conformation adoptée par les glycoprotéines arborant de telles structures glycanniques tronquées (Duvet *et al.* 1999),

- le glycanne Man₅-GlcNAc₂ pouvait être reglucosylé grâce au cycle gluco/dégluco décrit précédemment (Ermonval *et al.* 2000),

le glycanne majeur retrouvé sur les glycoprotéines était le Man₄-GlcNAc₂. (Duvet *et al.* 1998 ; Ermonval *et al.* 1997).

Dans la première partie de l'étude, nous avons déterminé la structure exacte du glycanne Man₄-GlcNAc₂ en utilisant l' α 1-2 mannosidase produite chez *Aspergillus saïto*. Comme attendu, nous avons obtenu uniquement le glycanne Man₃-GlcNAc₂ ce qui signifie que la structure du Man₄-GlcNAc₂ est la suivante Man(α 1-2)Man(α 1-3)[Man(α 1-6)]Man(β 1-4)GlcNAc(β 1-4)GlcNAc et que ce glycanne est le résultat de l'action d'une α 1-2 mannosidase réticulaire sur le Man₅-GlcNAc₂.

Dans la deuxième partie du travail, nous avons montré que cette α 1-2 mannosidase est une mannosidase de classe I sur la base de son inhibition par des analogues structuraux de type pyrannique que sont la kifunensine et le DMM (desoxymannojirimycine).

Dans la dernière partie, nous avons cherché à établir les relations pouvant exister entre cette mannosidase et l'UGGT qui catalyse la réaction de glucosylation. Pour cela, nous avons effectué des expériences de marquage métabolique suivies d'une chasse, en présence ou non de kifunensine (inhibiteur des mannosidases de classe I) et de castanospermine (inhibiteur des alpha glucosidases). En présence de ce dernier uniquement, nous avons montré que le taux de Glc₁-Man₅-GlcNAc₂ restait stable alors que le taux de Man₅-GlcNAc₂ diminuait avec une augmentation parallèle du taux de Man₄-GlcNAc₂.

En présence de kifunensine et de castanospermine, le taux de Man₄-GlcNAc₂ restait stable alors que celui du Man₅-GlcNAc₂ diminuait au profit du Glc₁Man₅-GlcNAc₂.

Ainsi, l'ensemble de ces résultats nous a permis de montrer que le glycanne Man₅-GlcNAc₂ subissait la double action d'une α 1-2 mannosidase et de l'UGGT (Fig. 13). Lorsque l' α 1-2 mannosidase agit, elle génère le Man₄GlcNAc₂ qui interdit toute possibilité ultérieure de remise en conformation d'une glycoprotéine porteuse de ce type de glycanne. Ainsi, cette α 1-2 mannosidase pourrait être à l'origine du signal entraînant les glycoprotéines mal conformées vers la voie de l'ERAD.



Figure 13 : Devenir du glycanne Man₅-GlcNAc₂ dans le réticulum endoplasmique des cellules CHO mutantes de glycosylation B3F7.

Après transfert du Glc₃-Man₅-GlcNAc₂, une déglucosylation rapide conduit au Man₅-GlcNAc₂. Porté par une glycoprotéine mal conformée, ce glycanne peut subir l'action de l'UGGT qui génère le glycanne Glc₁-Man₅-GlcNAc₂. Ce dernier autorise l'interaction de la glycoprotéine qui le porte avec la calnexine ou la calréticuline pour permettre la correction de sa mauvaise conformation par des foldases telles que la PDI ou la PPI. L'action de la glucosidase II génère à nouveau le glycanne Man₅-GlcNAc₂ et arrête ce processus de correction. Tant que le glycanne Man₅-GlcNAc₂ est présent à la surface d'une glycoprotéine, ce cycle gluco/dégluco peut avoir lieu. Dès lors qu'une mannosidase de classe I réticulaire agit, mannosidase qui reste à caractériser, ce cycle est définitivement interrompu car le glycanne Man₄-GlcNAc₂ formé ne peut plus être glucosylé par l'UGGT. La kifunensine, un inhibiteur puissant de mannosidase I, empêche la formation du Man₄-GlcNAc₂ et permet la formation d'un taux plus important de Glc₁-Man₅-GlcNAc₂.

Ce travail a fait l'objet de la publication suivante:

"Reciprocal relationship between a1-2 mannosidase processing and reglucosylation in the rough endoplasmic reticulum of Man-P-Dol deficient cells", (2000) Duvet S., Chirat F., Mir A.M., Verbert A., Dubuisson J. And Cacan R. Eur. J. Biochem., 267, pp 1146-1152.
II-2 Effet de l' α 1-2 mannosidase réticulaire sur la réponse UPR

Nous avons vu dans le chapitre précédent que le ralentissement du transit des glycoprotéines dans la voie de sécrétion des cellules B3F7 est imputé au fait que ces cellules transfèrent sur leurs protéines le précurseur glycannique tronqué Glc₃-Man₅-GlcNAc₂. François Foulquier, dont j'ai scientifiquement codirigé le travail de D.E.A. avec le Pr René Cacan, a poursuivi ce travail en émettant l'hypothèse que des cellules transférant sur leurs protéines des glycannes tronqués, devaient présenter une réponse UPR subnormale comparée à celle d'une cellule présentant une glycosylation de type sauvage.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons utilisé 3 lignées cellulaires différentes : les cellules CHO Pro⁻⁵ (cellules auxotrophes pour la proline) qui présentent une glycosylation de type sauvage, les cellules B3F7 vues précédemment et les cellules AP2-1 qui dérivent de cellules B3F7 transfectées de façon stable avec un plasmide codant la phosphatase alcaline placentaire humaine exprimée sous sa forme secrétée (PAts) (Ermonval *et al.* 2000).

Dans une première série d'expériences, nous avons vérifié d'une part, grâce à des expériences de marquage métabolique au [2-³H]-Man, que les glycannes portés par les glycoprotéines synthétisées par les cellules AP2-1 étaient bien du type Man₄-GlcNAc₂ et d'autre part, grâce à des expériences d'immunoprécipitation, que les cellules AP2-1 sécrétaient effectivement la PAts. Lors de cette dernière étude, nous avons été très surpris de constater que la PAts apparaissait toujours en association avec la GRP78, protéine chaperon témoin de la réponse UPR.

Nous avons ensuite comparé le taux d'expression transcriptionnelle de la GRP 78, produit dans les cellules B3F7, avec celui produit dans les cellules Pro⁻⁵ en utilisant la technique de RT-PCR semi-quantitative et en utilisant comme contrôle interne, l'expression de l'ARNm de la β -actine. Nous avons ainsi montré que le taux d'expression de l'ARNm de la GRP78 était 2,5 fois plus important dans les cellules B3F7 que dans les cellules Pro⁻⁵, indiquant ainsi le stress constitutionnel des cellules B3F7.

Dans une 3^{eme} partie de l'étude, nous avons montré que la kifunensine qui inhibe l' α 1-2 mannosidase réticulaire impliquée dans la transformation du glycanne Man₅-GlcNAc₂ en Man₄-GlcNAc₂ avait 2 effets. Le premier est de diminuer le taux d'expression de l'ARNm de la GRP78 dans les cellules AP2-1. Cette observation a été confirmée par immuno-précipitation de la Pats, synthétisée par ces cellules en présence de kifunensine, qui s'est traduite par la quasi-disparition de la GRP78 (voir les résultats ci-dessus). Le second effet est

d'entraîner une augmentation significative de la sécrétion de la Pats, comparée à celle obtenue avec des cellules AP2-1 cultivées en absence de kifunensine.

L'ensemble de ces résultats nous a permis de montrer que :

- des cellules peuvent présenter un stress du réticulum endoplasmique, en absence d'une privation en glucose. Rappelons que la GRP78, protéine qui joue un rôle central dans la réponse UPR, a été découverte dans des cellules privées de glucose et a reçu en conséquence le terme GRP pour Glucose Regulated Protein,

- des cellules transférant un précurseur glycannique tronqué de type Glc₃-Man₅-GlcNAc₂ présentent une réponse UPR plus importante que celle observée dans des cellules transférant le Glc₃-Man₉-GlcNAc₂.

- l'action de l'α1-2 mannosidase réticulaire, qui agit de façon compétitive avec la glucosidase II (voir paragraphe II.2.2.1), a pour effet d'écarter prématurément du cycle gluco/dégluco les glycoprotéines mal conformées, ce qui se traduit au niveau cellulaire par :

• une réponse UPR maintenue en permanence à un taux subnormal

• un adressage de ces glycoprotéines vers la voie de l'ERAD comme semble nous l'indiquer le taux de sécrétion plus faible de la Pats observé en absence de kifunensine.

Ce travail a fait l'objet de la publication suivante :

"The unfolded protein response in a dolichyl phosphate mannose-deficient Chinese hamster ovary cell line points out the key role of a demannosylation step in the quality-control mechanism of N-glycoproteins", (2002) Foulquier F., Harduin-Lepers A., Duvet S., Marchal I., Mir A.M., Delannoy P., Chirat F. and

Cacan R.

Biochem J. 362, pp 491-498.

II-3 Dégradation préférentielle des glycoprotéines portant des glycannes tronqués.

La présomption, selon laquelle les glycoprotéines porteuses de glycannes tronqués de type Man₅-GlcNAc₂ étaient davantage dégradées que celles porteuses de glycannes de type Man₉-GlcNAc₂, était très forte mais n'avait jamais été démontrée. Pour apporter la preuve de ce fait, nous nous sommes inspirés des travaux de Shang *et al.* (2002). Ces auteurs ont montré que, lors d'une période de privation en glucose, les Dol-P-P-OS apparaissent tronqués mais que très rapidement, ils recouvraient leur taille normale, grâce à la réponse UPR développée par ces cellules. Nous avons mis à profit cette propriété pour faire coexister, dans la même

cellule, des espèces glycanniques de type Man₅-GlcNAc₂ et de type Man₉-GlcNAc₂. Pour cela nous avons utilisé les cellules CHO MI8-5 incapables de fabriquer des Dol-P-P-OS glucosylés. Lorsque ces cellules sont cultivées 40 min. en présence de 0,175mM de Glc (au lieu des 5mM physiologiques), on observe après un marquage d'une heure au [2-³H] Man, la présence équimolaire de glycanne de type Man₅-GlcNAc₂ et de type Man₉-GlcNAc₂. Ces espèces, comme nous l'avons mentionné précédemment, subissent l'action d'une part, d'une α1-2 mannosidase pour donner respectivement les espèces Man₄-GlcNAc₂ et Man₈-GlcNAc₂, et d'autre part de l'UGGT pour conduire aux espèces Glc₁-Man5-GlcNAc₂ et de type Glc₁-Man₉-GlcNAc₂. Il convient de rappeler que l'UGGT utilise l'UDP-Glc comme donneur de Glc et non le Dol-P-Glc que la cellule MI8-5 est incapable de synthétiser. Ainsi, les espèces glycanniques glucosylées sont le reflet du processus de remise en conformation des glycoprotéines par le biais du cycle gluco/dégluco. De même, les taux d'oligosaccharides libres de type OS-gn₁, Glc₁-Man₅-GlcNAc₁ et de type Glc₁-Man₉-GlcNAc₁, sont le reflet de la dégradation des glycoprotéines mal conformées. En comparant le rapport du taux des oligosaccharides libres Glc₁-Man₅-GlcNAc₁ / Glc₁-Man₉-GlcNAc₁ avec le rapport du taux des oligosaccharides liés aux protéines Glc₁-Man₅-GlcNAc₂ / Glc₁-Man₉-GlcNAc₂, nous avons montré qu'il y avait 2 fois plus d'espèce Glc₁-Man₅-GlcNAc₁ que d'espèce Glc₁-Man₉-GlcNAc₁. Ainsi, ces résultats démontrent sans ambiguïté que les glycoprotéines porteuses de glycannes tronqués sont davantage dégradées que celles portant des glycannes de taille normale. Cette étude a donné lieu à la publication suivante :

"Endoplasmic reticulum-associated degradation of glycoprotéins bearing Man₅-GlcNAc₂ and Man₉-GlcNAc₂ species in the Mi8-5 CHO cell line", (2004) Foulquier F., Duvet S., Klein A., Mir A.M., **Chirat F**. and Cacan R. Eur.J.Biochem. **271**, pp 398-404.

II-4 Etude des Dol-P-P-OS au cours de la production de l'IFN- γ par des cellules CHO.

Dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe du Pr Jean Louis GOERGEN du Laboratoire des Sciences du Génie Chimique (LSGC) de l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires (ENSAIA) à l'Institut National Polytechnique de Lorraine (INPL), nous avons appliqué nos compétences acquises sur les premières étapes de la biosynthèse des glycoprotéines à l'étude des causes de la sous glycosylation progressive, observée lors de la production par voie recombinante de l'interféron Gamma (IFN- γ). L'IFN- γ . est une Nglycosylprotéine qui renferme 2 sites de N-glycosylation sur les Asn 25 et 97. Dans les 1ères heures de la production de l'IFN- γ , les 2 sites apparaissent majoritairement glycosylés (forme 2N), les formes mono glycosylées (forme 1N) et non glycosylées (forme 0N) apparaissant mineures. Très rapidement, la forme 2N diminue au profit des formes 1N et ON. Pour comprendre cette diminution progressive du taux de glycosylation, le LSGC a entrepris 3 études parallèles, à savoir:

- l'étude de l'influence du milieu de culture,
- l'analyse qualitative et quantitative des glycannes associées aux Dol-P-P-OS,
- la quantification des nucléotides et nucléotides sucres intracellulaires.

Pour le second point, nous avons tout d'abord entrepris l'étude qualitative des glycannes associés au dolichol et aux protéines par marquage radioactif au Man tritié et analyse par CLHP en phase normale. Quant à l'analyse quantitative des Dol-P-P-OS, nous avons utilisé la technique FACE décrite par Jackson en 1990. Brièvement, après libération des glycannes des Dol-P-P-Os, les glycannes sont couplés à l'ANTS (8-aminonaphtalene 1, 3, 6 tri sulfonic acid) qui est une amine aromatique fluorescente porteuse de 3 charges négatives. Les glycannes ainsi marqués sont séparés selon leur rapport masse/charge sur un gel de polyacrylamide et détectés par fluorescence. La quantification est basée sur l'intensité de fluorescence qui est proportionnelle au taux de glycannes. Les résultats que nous avons obtenus révèlent qu'il n'y a pas corrélation entre les changements que nous avons observés au niveau des dolichols (changements qui interviennent en fin de cinétique) et la sous glycosylation observée sur l'IFN-y. Toutefois, nos travaux ont révélé que le taux de Dol-P-P-OS dans des cellules CHO, cultivées dans un milieu PF-BDM, est 2 fois supérieur à celui observé dans les cellules cultivées dans un milieu SF-RPMI. En parallèle, et de façon très intéressante, nous avons observé que dans les cellules présentant un taux plus important de Dol-P-P-OS, le taux des formes 2N, 1N et 0N reste stable tout au long de la culture.

En parallèle de cette étude, l'équipe du Pr J.L. Goergen a mis au point une technique de dosage des principaux nucléotides et nucléotides-sucre intra cellulaires (Kochanowski *et al.* 2006) pour le suivi de leurs variations quantitatives et de la charge énergétique au cours de la culture des cellules en milieu SF-RPMI et PF-BDM. Les résultats révèlent que la synthèse de l'UTP et de l'UDP-Glc pourrait constituer un facteur limitant au cours de la culture des cellules en milieu SF-RPMI. De même, le calcul de la charge énergétique a montré que sa diminution importante corrèle celle du taux de la forme 2N de l'IFN- γ .

Ces résultats ont conduit à la publication :

Kochanowski N., Blanchard F., Cacan R., Chirat F., Guedon E., Marc A. and Goergen J.L. (2008)

Influence of intracellular nucleotide and nucleotide sugar contents on recombinant interferon-gamma glycosylation during batch and fed-batch cultures of CHO cells. Biotechnol. Bioeng., **100**, 721-733.

III- Conclusion générale

Concernant la recherche du signal moléculaire responsable de l'envoi des glycoprotéines mal conformées dans la voie de dégradation, nos travaux ont permis de mettre en lumière le rôle crucial que joue une α -1-2 mannosidase réticulaire. Quelque temps plus tard, il a été mis en évidence chez Saccharomyces cerevisiae une protéine nommée EDEM pour « ER degradation enhancing α -mannosidase-like protein » qui joue, en plus de toutes les protéines que nous avons décrites dans les pages précédentes, un rôle également très important dans le processus ERAD (Molinari et al. 2003 ; Oda et al. 2003). Chez l'homme, 3 protéines homologues nommées EDEM 1, EDEM 2 et EDEM 3 ont été décrites. Ces protéines ont en commun de présenter une forte homologie avec les mannosidases de type I mais semblent dénuées de toute activité mannosidasique, que ce soit in vivo ou in vitro. Leur surexpression s'accompagne d'une augmentation du processus ERAD alors qu'une sousexpression conduit à un ralentissement de ce processus. Physiologiquement, le stress ER entraîne leur surexpression. Il a également été démontré que l'extrémité C-terminale des protéines EDEM interagit avec la calnexine. Leur rôle est d'extraire du cycle gluco/dégluco (en particulier de la calnexine) les glycoprotéines mal conformées arborant une structure oligomannosidique tronquée de type Man₈GlcNAc₂, voire Man₅₋₇GlcNAc₂. Ces glycoprotéines sont ensuite envoyées dans le cytosol où elles sont ubiquitinées pour être adressées au protéasome chargé de leur dégradation.

D) ETABLISSEMENT DU N- ET O-GLYCOME SERIQUES DANS UN CONTEXTE PATHOLOGIQUE

Lors du dernier plan quadriennal de notre unité, j'ai souhaité réorienter mes activités de recherche vers une thématique alliant à la fois les compétences structurales et biologiques que j'avais acquises dans le domaine de la glycobiologie. Ce sont pour ces raisons que j'ai rejoint l'équipe « glycobiologie de la signalisation cellulaire », dirigée par Jean Claude Michalski dans l'axe de recherches intitulé «Fonctions, Pathologie ». Les travaux présentés ci-dessous ont été réalisés sous la direction scientifique du Dr Willy Morelle.

I-Introduction

Dans les chapitres précédents, nous avons mentionné que le statut de glycosylation d'une glycoprotéine module les propriétés biologiques de cette dernière. De la même façon, nous avons vu que le statut de glycosylation d'une protéine dépend de nombreux facteurs. Dans le premier cas, on comprend que toute altération des capacités de glycosylation, suite à une mutation d'une enzyme ou d'une protéine impliquée dans la glycosylation ou d'un transporteur de nucléotides sucres, se traduit par de multiples perturbations au niveau cellulaire qui affecteront la survie de l'organisme. C'est ce qui est observé dans les maladies de glycosylation innées. Dans le second cas, qui correspond à un contexte pathologique (autre que celui lié directement à la glycosylation), on peut s'attendre à une perturbation des capacités de glycosylation des cellules affectées. Ces perturbations sont classées dans les pathologies de glycosylation dites acquises.

I-1 Les maladies innées de la glycosylation

Dans le cas des maladies innées de la glycosylation (notées CDG pour Congenital Disorders of Glycosylation), les modifications du statut de glycosylation des glycoprotéines (taux de glycosylation ou modification de la structure des glycannes) sont évidentes puisque ces maladies résultent directement d'un défaut dans leur biosynthèse. Depuis 1980, date de la première caractérisation d'une pathologie liée à un défaut dans le processus de biosynthèse des glycannes, le nombre de telles maladies n'a cessé d'augmenter (Jaeken et Matthijs, 2007). Dans le cas de la N-glycosylation, les CDG sont classés en 2 groupes suivant que le défaut enzymatique affecte la biosynthèse du précurseur tétradécasaccharidique (Glc₃-Man₉-

GlcNAc₂-P-P-Dolichol) ou le devenir de ce précurseur une fois transféré sur une protéine. Dans le premier cas, il s'agit de CDG de type I alors que dans le second, il s'agit de CDG de type II. A l'intérieur de chacun de ces sous-groupes, on distingue plusieurs CDG en fonction de l'enzyme ou de la protéine déficiente. Ces CDG sont, en plus de leur type I ou II, identifiés par une lettre minuscule. A ce jour, 13 CDG de type-I et 8 CDG de type II ont été clairement identifiés (Fig. 14 et Tableau III). Un quatorzième CDG de type-I a récemment été décrit par <u>Haeuptle et al.</u> (2008). Il résulte d'une mutation dans la protéine RFT1 impliquée dans la translocation du Dol-P-P-GlcNAc₂-Man₅ dans le réticulum endoplasmique et se traduit par une accumulation de ce précurseur oligosaccharidique dans la cellule. Les auteurs proposent de le nommer CDG-In. Enfin, il existe de nombreux autres cas de CDG qui ne peuvent pas encore être classés car l'origine du défaut reste méconnue. Ces CDG sont alors notés CDG-Ix ou CDG-IIx.

Du point de vue de la recherche, les cellules de patients atteints de ces pathologies constituent d'excellents outils pour explorer de façon fine les voies métaboliques impliquées dans la glycosylation.

I-2 Les maladies acquises de glycosylation

Comme mentionné précédemment, il s'agit de défauts de glycosylation observés sur les glycoprotéines de patients atteints d'une pathologie dont l'origine primaire ne concerne pas la machinerie de glycosylation. Depuis quelques années, le nombre d'articles relatant ce point est en constante progression. A titre d'exemples, les pathologies qui illustrent le mieux ces changements sont :

les cancers (Yamashita *et al.* 1989; Dennis *et al.* 1999); Dube et Bertozzi 2005) au cours desquels une antennarisation plus importante au niveau des N-glycannes est observée (Buck *et al.*1971),

- la polyarthrite rhumatoïde (Pareck *et al.* 1985 ; Flogel *et al.* 1998) qui conduit à une sous-galactosylation et à une sous-fucosylation des N-glycannes des IgG,

- les maladies hépatiques comme la cirrhose qui se caractérisent par une hyposialylation et une hypogalactosylation mais une hyperfucosylation au niveau du résidu de GlcNAc du point d'attache et un taux élevé de GlcNAc intercalaire (Callewaert *et al.* 2004 ; Paradis 2005, Morelle *et al.* 2006a),



Figure 14 : Représentation des déficits enzymatiques ou protéiques à l'origine des différents CDG rapportés à ce jour (à l'exception des CDG-IIe et IIg). Les croix rouges symbolisent les CDG de type I qui affectent la biosynthèse du précurseur tétradécasaccharidique, uniquement réticulaire. Les croix vertes symbolisent les CDG de type II qui affectent la maturation (élagages et ajouts de monosaccharides) de la copule glycannique dans le réticulum et l'appareil de golgi. Le tableau III page 54 présente le nom des différentes enzymes et protéines mutées pour chacun des CDG. Pour une vision plus complète du cycle des dolichols, le lecteur est invité à se reporter à la figure 8. Un CDG de type-I affectant la protéine RFT1 a été récemment décrit mais n'a pas été formellement nommé CDG-In. (Figure d'après Eklund and Freeze 2006).

Type de CDG	Protéine ou activité enzymatique déficiente	Référence bibliographique	
CDG-Ia	Phosphomannomutase II	Van Schaftingen and Jaeken (1995)	
CDG-Ib	Phosphomannose isomerase	Niehues et al. (1998)	
CDG-Ic	Dol-P-Glc:Man9-GlcNAc2-P-P-Dol glucosyltransferase	Körner <i>et al.</i> (1998)	
CDG-Id	Dol-P-Man:Man5-GlcNAc2-P-P-Dol mannosyltransferase	Denecke et al. (2004)	
CDG-Ie	GDP-Man:Dol-P-mannosyltransferase	Imbach <i>et al.</i> (2000) ; Kim <i>et al.</i> (2000)	
CDG-If	Utilisation du Mannose-P-dolichol 1 (rôle inconnu)	Kranz <i>et al.</i> (2001) ; Schenk <i>et al.</i> (2001)	
CDG-Ig	Dol-P-Man:Man7-GlcNAc2-P-P-Dol mannosyltransferase	Chantret et al. (2002)	
CDG-Ih	Dol-P-Glc:Glc1Man9-GlcNAc2-P-P-Dol glucosyltransferase	Chantret et al. (2003)	
CDG-Ii	GDP-Man:Man1-GlcNAc2-P-P-Dol mannosyltransferase	Thiel <i>et al.</i> (2003)	
CDG-Ij	UDP-GlcNAc: Dol-P-GlcNAc-P transferase	Wu et al. (2003)	
CDG-Ik	GDP-Man:GlcNAc2-P-P-Dol mannosyltransferase	Grubenmann et al. (2004)	
CDG-IL	Dol-P-Man:Man6-GlcNAc2-P-P-Dol mannosyltransferase et Dol-P-Man:Man8-GlcNAc2-P-P-Dol mannosyltransferase	Frank <i>et al.</i> (2004)	
CDG-Im	Dolichol kinase (DK1)	Kranz et al. (2007b)	
CDG-In	RFT1 (nommée également flippase)	Haeuptle et al. (2008)	
CDG-IIa	N-acetylglucosaminltransferase II	Jaeken et al. (1994)	
CDG-IIb	Glucosidase I	De Praeter et al. (2000)	
CDG-IIc	Transporteur du GDP-Fuc dans le Golgi	Lübke et al. (1999)	
CDG-IId	β1,4-galactosyltransferase I	Hanßke <i>et al.</i> (2002)	
CDG-IIe	Sous unité Cog-7 impliquée dans le trafic golgien	Wu et al. (2004)	
CDG-IIf	Transporteur de l'acide sialique	Martinez-Duncker et al. (2005)	
CDG-IIg	Sous unité Cog-1 impliquée dans le trafic golgien	Foulquier et al. (2006)	
CDG-IIh	Sous unité Cog-8 impliquée dans le trafic golgien	Foulquier <i>et al.</i> (2007) ; Kranz <i>et al.</i> (2007a)	

Tableau III : Les différentes mutations affectant des enzymes, transporteurs ou protéines impliqués dans les maladies congénitales de glycosylation de type I (CDG-I) et II (CDG-II).

- la néphropathie à IgA (maladie due à un dépôt d'IgA1 au niveau du mésangium glomérulaire) pour laquelle on observe une hypo sialylation et hypo galactosylation (Allen *et al.* 2001).

Ces changements de glycosylation sont utilisés pour définir de nouveaux marqueurs diagnostiques et/ou pronostiques. C'est ainsi que Calleawaert et al. (2004) ont développé le GlycoCirrho Test qui permet de distinguer parmi les désordres hépatiques, ceux d'origine cirrhotique de ceux d'origine non cirrhotique. Le GlycoCirrho Test est obtenu en calculant le logarithme du ratio de la quantité du N-glycanne biantenné avec un résidu de GlcNAc intercalaire sur la quantité du N-glycanne tri antenné (l'analyse des glycannes est faite après leur désialylation enzymatique). Un autre exemple est celui de l'alpha foeto-protéine qui est une glycoprotéine utilisée dans le diagnostic des hépatocarcinomes. Le fait qu'une hyper α 1-6 fucosylation de la GlcNAc du point d'attache ait été mise en évidence, a permis l'élaboration d'anticorps monoclonaux dirigés contre le motif [Fuc α 1-6] GlcNAc à des fins diagnostiques et d'atteindre un taux de positivité de 95 % dans ce type de cancer (Noda et al. 1998 ; Li et al. 2001). Un dernier exemple, pour illustrer l'intérêt de définir de nouveaux marqueurs diagnostiques, est celui du cancer de la prostate pour lequel une augmentation de la PSA (Prostate Specific Antigen) est utilisée pour poser le diagnostic. Néanmoins, des tumeurs bénignes de la prostate engendrent également une augmentation de la PSA. Récemment, Fujimura et al. (2008) ont montré que l'haptoglobine isolée du sérum de patients atteints d'un cancer de la prostate présente un nombre de motifs sialyl-Lewis (x/a) plus important que celle isolée de patients sains ou présentant une tumeur bénigne.

I-3 Les techniques d'analyses du glycome

Le dépistage d'une maladie de glycosylation, qu'elle soit innée ou acquise, requiert idéalement de disposer d'une technique qui permet l'identification et la quantification de tous les glycannes portés par une ou un ensemble de glycoprotéines, sécrétées ou liées à des membranes.

Le profilage des glycannes peut s'effectuer directement sur la glycoprotéine entière, ou à partir des glycopeptides issus d'une protéolyse limitée de la glycoprotéine considérée ou encore sur leur forme libre. Cette dernière approche qui s'impose de plus en plus, nécessite leur libération préalable. Dans le cas des N-glycannes, cette étape se fait très majoritairement par voie enzymatique en utilisant la Peptide-N4-(acetyl-ß-glucosaminyl)- asparagine amidase F ou A, beaucoup mieux connue sous le nom de PNGase F ou A, qui coupe la liaison entre le 1^{er} résidu de GlcNAc du noyau de la copule N-glycannique et l'Asn de la protéine. Une autre enzyme, moins utilisée que la PNGAse F, est l'endo-N-acetylglucosaminidase H (ou endoglycosidase H ou encore Endo-H). Dans le cas des O-glycannes, il n'existe pas d'enzyme qui présente un spectre d'action aussi large que la PNGAse F. Aussi, la méthode de choix reste la β -élimination réductive. Cette méthode présente néanmoins l'inconvénient de libérer les Oglycannes sous leur forme réduite, interdisant ainsi toute réaction de couplage ultérieure à des amines aromatiques, chromophores ou fluorophores, neutres ou chargées. Un tel couplage présente 2 intérêts majeurs : celui d'augmenter la détectabilité des glycannes et celui de conférer des charges aux glycannes neutres lorsqu'une approche électrophorétique est envisagée.

L'étape qui suit la libération des glycannes est celle de leur caractérisation structurale. Le glycobiologiste dispose d'un large panel de techniques, qu'elles soient chromatographiques (en phase normale, en phase inversée, sur charbon actif, d'échange d'ions à haut pH ou d'affinité sur lectines), électrophorétiques sur gel de polyacrylamide (technique FACE pour Fluorophore-Assisted Carbohydrate Analysis) ou capillaire (Mechref et Novotny 2002). Quoique très performantes, ces méthodes ne possèdent pas une sélectivité suffisante pour séparer en une seule étape, l'ensemble des glycannes portés ne serait-ce que par une seule glycoprotéine. Pour atteindre un tel objectif, il est très souvent nécessaire de coupler différentes techniques séparatives.

La méthode qui s'impose depuis quelques années maintenant, est la spectrométrie de masse et tout particulièrement les techniques MALDI-TOF-MS et ESI-MS (Morelle and Michalski 2007; Harvey 2005; Zaia 2004). Celles-ci présentent les avantages de pouvoir analyser les glycannes en mélange, de présenter une grande sensibilité et une grande sélectivité. De plus, lorsque les glycannes sont analysés sous leur forme perméthylée, elles permettent d'ajouter une dimension quantitative (Wada *et al.* 2007). L'ensemble de ces caractéristiques est à la base du développement des approches glycomiques et glycoprotéomiques. L'approche glycomique consiste à établir la liste exhaustive des structures glycanniques présentes sur une glycoprotéine ou un ensemble de glycoprotéines appartenant à un fluide biologique (sérum, LCR, urine) ou à un type cellulaire entier ou restreint à un ou plusieurs organites. La seconde, nommée glycoprotéomique, s'inscrit dans la même logique que celle du glycome et consiste à établir le répertoire complet en glycoprotéines d'un système biologique donné (Abbott *et al.* 2008; Morelle *et al.* 2006b; Morelle and Michalski 2005; Hashii *et al.* 2005). La comparaison du glycome et/ou du glycoprotéome de 2 échantillons similaires (l'un issu par

exemple d'un patient sain et l'autre issu d'un patient atteint d'une pathologie) permet de mettre en lumière un certain nombre de changements qui constituent autant de pistes nouvelles de recherches.

II- Mise au point d'une approche glycomique pour le dépistage de défauts de biosynthèse des N- et/ou O-glycannes

Lorsqu'une mutation génétique touche l'une des nombreuses protéines que compte la machinerie de glycosylation, l'ensemble des glycannes requérant l'intervention de la protéine mutée est modifié. Devant l'étendue des signes cliniques présentés par les enfants atteints, les soupçons d'une maladie congénitale de glycosylation sont alors très forts. Jusqu'à présent, le diagnostic de telles maladies repose sur l'analyse par iso electro focalisation (IEF) de la sérotransferrine (Yamashita et al. 1993), une N-glycosyl protéine, et de l'apolipoprotéine CIII (apo-CIII) (Wopereis et al. 2003), une O-glycosylprotéine. Le principe de cette méthode est simple. En cas de sous-glycosylation qui caractérise les CDG de type I ou dans certains cas de CDG-II pour lesquels la maturation des N-glycannes se traduit, directement ou non, par un défaut de la sialylation, on observe une nette diminution des formes sialylées de la STF et donc un déplacement vers la cathode de ces isoformes. Malheureusement, tous les CDG ne voient pas forcément leur profil de sialylation modifié et ne sont donc pas dépistés par cette méthode. C'est le cas notamment des CDG-IIb, IIc et IIf. Quant à l'IEF de l'apo-CIII, elle permet de détecter les anomalies de biosynthèse des O-glycannes (uniquement ceux bâtis sur un noyau de type I). Il y a d'autres causes possibles à ces sous-diagnostics de CDG (faux négatifs) comme ceux rapportés lors de certaines maladies mitochondriales (Briones et al. 2001). A l'inverse certaines modifications acquises de la glycosylation peuvent s'apparenter à des CDG (faux positifs) : c'est le cas de patients alcooliques (Helander et al. 2001). D'autres techniques de dépistage, basées sur l'utilisation d'autres modèles glycoprotéiques ou sur d'autres techniques d'analyses, ont été proposées (le lecteur est invité à lire l'article présenté à la fin de ce chapitre) pour affiner le diagnostic.

Notre idée de proposer une technique permettant le dépistage simultané des défauts de N- et/ou O- glycosylation a été inspirée par les travaux de Wopereis et al. (2005). Ces auteurs ont montré qu'en analysant le profil IEF de la sérotransferrine et de l'apo-CIII et le comportement électrophorétique de l'apo-CIII sur un gel SDS-PAGE, il était possible d'établir 6 sous-groupes différents parmi des patients étiquetés CDG-IIx. L'intérêt d'une telle approche est de permettre de restreindre le nombre de cas possibles pouvant expliquer les défauts observés. Néanmoins, une analyse IEF ne permet d'avoir qu'une image partielle du statut de sialylation d'une glycoprotéine et en aucun cas, une idée précise de la structure des glycannes. A titre d'exemple, la forme non sialylée de l'apo-CIII (notée Apo-CIII₀) peut être représentée par la forme non glycosylée, la forme glycosylée avec un seul résidu de GalNAc ou encore la forme glycosylée avec le disaccharide Gal β 1-3 GalNAc. Dans le but d'avoir une vision d'ensemble sur les potentialités de *N*- et *O*-glycosylation d'un patient et de pallier l'absence de structure détaillée des N- et O-glycannes analysés par analyse IEF, nous avons développé la stratégie présentée dans le schéma 3. Cette stratégie a été appliquée à l'analyse des glycannes des glycoprotéines sériques d'un sujet atteint d'un CDG-IIa (causé par la déficience de la GlcNAc Tf-II) et d'un sujet atteint d'un CDG-IIg (causé par une déficience au niveau de la sous-unité Cog 1 du complexe COG).

Dans le cas du sérum CDG-IIa, notre stratégie révèle une très nette augmentation du Nglycanne mono-antenné mono-sialyl aux dépens du N-glycanne bi-antenné bi-sialylé. Ce résultat est logique dans la mesure où l'enzyme mutée dans le CDG-IIa est la Nacetylglucosaminyl transférase II qui permet de greffer un résidu de GlcNAc sur le Man α 1-6 du noyau pentasaccharidique, initiant ainsi l'élaboration d'une seconde antenne sur un Nglycanne. Comme attendu, aucune modification du profil de O-glycosylation n'a été observée pour ce sérum.

Dans le cas du CDG-IIg, les profils de glycosylation (N- et O-) des glycoprotéines sériques révèlent une sous-galactosylation et une sous-sialylation. Ce résultat, qui montre que le défaut de glycosylation affecte à la fois le processus de N- et O- glycosylation, est logique quand on sait que le CDG-IIg est dû à un défaut dans la sous-unité Cog 1 du complexe COG, impliqué dans le fonctionnement correct de l'appareil de Golgi (Ungar *et al.* 2006)

Les résultats obtenus ont fait l'objet de l'article suivant :

"A rapid mass spectrometric strategy for the characterization of N- and O-glycan chains in the diagnosis of defects in glycan biosynthesis" Faid V., Chirat F., Seta N., Foulquier F. and Morelle W. (2007) Proteomics 7, pp 1800-1813.



Schéma 3 : stratégie pour l'étude du O- et N-glycome d'une glycoprotéine purifiée ou d'un mélange de glycoprotéines. Après réduction et alkylation, les protéines et glycoprotéines sont hydrolysées en peptides et glycopeptides. La PNGase F libère sélectivement les N-glycannes qui sont séparés des O-glycopeptides par chromatographie sur Sep Pack C18. Les O-glycannes sont libérés par traitement alcalin en milieu réducteur. Les O-et N-glycannes sont ensuite perméthylés et analysés successivement par MALDI-TOF-MS, nano-ESI-MS-MS et GC-MS pour déterminer respectivement la composition en monosaccharides, la séquence ainsi que le type d'antennes et la nature des liaisons interglycosidiques. La digestion partielle des N-glycannes par des exoglycosidases spécifiques suivie des traitements énoncés permet de confirmer les résultats obtenus.

Projets de recherches

Comparaison du potentiel de glycosylation de fibroblastes humains sains versus fibroblastes humains atteints d'une mucopolysaccharidose de type I (MPS-I)

I- Les maladies d'accumulation lysosomale

Le métabolisme des glycoconjugués comprend leur biosynthèse (ou anabolisme) et leur dégradation (ou catabolisme). L'équilibre entre ces 2 voies participe à l'homéostasie cellulaire. Dès lors que cet équilibre est rompu, il s'ensuit de graves perturbations dans les fonctions des cellules atteintes et par extension, des tissus et organes correspondants. Nous avons présenté, dans le chapitre précédent, nos implications dans le dépistage des maladies liées à la biosynthèse de la copule glycannique. Nous nous proposons, de compléter, tant sur le plan personnel que sur le plan de l'UMR 8576 du CNRS, ce champ d'études du domaine de la glycopathologie avec l'étude du catabolisme de la copule glycannique. D'une façon générale, l'incapacité d'une cellule à dégrader certaines macromolécules se traduit par une accumulation, dans le lysosome, du métabolite incomplètement dégradé. Par conséquent, ces maladies sont nommées maladies d'accumulation lysosomales, mieux connues sous le terme anglo-saxon de LSD pour Lysosomal Storage Diseases.

Pour les raisons que nous allons développer dans les paragraphes suivants, nous nous proposons d'étudier l'influence que pourraient avoir les mucopolysaccharidoses de type I (MPS I) sur le statut de glycosylation des glycoprotéines circulantes ainsi que sur celles localisées dans le lysosome. Ce travail vise à mettre en lumière un certain nombre de changements pouvant constituer des pistes de recherches vers la compréhension des mécanismes physiopathologiques qui conduisent aux désordres multi-systémiques observés lors des LSD et qui restent à ce jour largement méconnus.

II- Le lysosome

La dégradation des macromolécules biologiques a lieu dans un organite spécialisé nommé le lysosome. Celui-ci a été découvert par de Duve et ses collaborateurs en 1955, ce qui lui vaudra le prix Nobel en 1974. (Bainton 1981). Il représente environ 5 % du volume total de la cellule et est caractérisé par un pH intra-lysosomal acide (4.6 à 5), maintenu grâce à une pompe à proton ATP dépendante (Mellman *et al.* 1986).

II-1. Les différentes voies de dégradation

Les molécules à dégrader sont adressées aux lysosomes par 4 voies distinctes (Luzio 2000). La plus simple concerne les molécules du cytosol qui arrivent aux lysosomes grâce à

des transporteurs. La seconde voie d'arrivée au lysosome est l'endocytose (les molécules sont emprisonnées dans une vésicule dite endolytique issue de l'invagination de la membrane cytoplasmique). Cette vésicule endolytique fusionne ensuite avec un endosome précoce. Ce dernier subit alors une série de remaniements complexes qui se traduisent par l'apparition de nombreuses vésicules intra-endosomales pour générer un endosome tardif (nommé également corps multi-vésiculaire (multivesicular bodies). Cet endosome tardif fusionne ensuite avec un lysosome pour constituer un organite hybride dans lequel les processus de dégradation à proprement parler ont lieu (Fig. 15). La troisième voie est celle de la phagocytose qui permet l'internalisation de particules insolubles (bactéries, virus, etc.) dans une vésicule nommée le phagosome qui fusionne, à terme, avec le lysosome. Enfin, la quatrième voie est représentée par l'autophagie qui correspond à un processus de dégradation de constituants intracellulaires incluant des organelles. Ces constituants à dégrader se retrouvent dans une vésicule nommée autophagosome qui, comme pour le phagosome, viendra fusionner avec un lysosome. En fait, la fusion de ces différentes vésicules avec les lysosomes conduit temporairement à un organite « hybride » et c'est dans cet organite « hybride » que les molécules à dégrader sont prises en charge par les hydrolases ad hoc, parmi la quarantaine d'hydrolases recensées à ce jour. (Schröder et al. 2007). A la fin du catabolisme, un processus de recyclage des constituants membranaires de cet organite « hybride » permet de reformer le lysosome. Notons enfin que le lysosome possède également la faculté de pouvoir fusionner avec la membrane plasmatique pour libérer son contenu lytique à l'extérieur de la cellule. Cette propriété est impliquée dans bon nombre de fonctions de toute première importance comme la lyse de cellules reconnues comme étrangères lors de la réponse immunitaire de type cellulaire T cytotoxique (Stinchcombe et al. 2006).

II-2. L'adressage des hydrolases au lysosome

La dégradation des macromolécules est bien souvent le fruit de l'action concertée de plusieurs hydrolases. Leur biosynthèse dans la plupart des cas débute dans le réticulum endoplasmique. Alors qu'elles sont en cours d'élongation, ces enzymes sont N-glycosylées de façon co-traductionnelle. Elles sont ensuite transférées dans l'appareil de Golgi où elles sont reconnues par une phosphotranférase, l'UDP-*N*-acetyl-glucosaminyl-1-phosphotransférase, qui va transférer sur le carbone 6 d'un des résidus de mannose du *N*-glycanne, un résidu GlcNAc-1-phosphate à partir d'UDP-GlcNAc. Une seconde enzyme, la *N*-acetylglucosamine-1-phosphodiester- α -*N*-acetylglucosaminidase va libérer le résidu de GlcNAc et générer un



Figure 15 : Les différentes voies de dégradation des macromolécules par le lysosome.

Voie **A** : les molécules du milieu extra cellulaire sont internalisées par endocytose pour former un endosome précoce (Ep) qui fusionne avec des vésicules golgiennes (1) pour donner un endosome tardif (Et) qui fusionne à son tour avec le lysosome (Ly) où s'effectue la dégradation complète des molécules endocytées. Voie **B** : elle correspond à l'internalisation de particules solides (bactéries, virus...) par phagocytose : le phagosome (Ph) formé fusionne ensuite avec le lysosome. Voie **C** : elle correspond à la dégradation d'organelles par autophagie : l'autophagosome (APh) constitué de l'organelle entourée d'une membrane, fusionne comme pour la voie B, avec le lysosome. Les composants golgiens du lysosome sont ensuite recyclés vers l'appareil de Golgi (2) après libération de leur contenu dans le lysosome. Enfin, le lysosome possède la capacité de fusionner avec la membrane cytoplasmique (3) pour libérer son contenu lytique à l'extérieur.

Go, appareil de Golgi ; RE, réticulum endoplasmique ; N, noyau.

résidu Man-6-P sur le N-glycanne (Reitman and Kornfeld 1981; Waheed *et al* 1981) (Fig. 16). Dans le trans-Golgi, ce résidu est reconnu spécifiquement par un récepteur (Hickman and Neufeld 1972) qui, via une vésicule de transport, adressera les enzymes porteurs de ce signal vers un endosome précoce. Le pH acide de ce dernier entraîne une dissociation du complexe enzyme/récepteur Man-6-P avec libération de l'enzyme dans la lumière endosomale. A noter que l'absence de récepteur à Man-6-P constitue une caractéristique du lysosome. C'est par ce trafic intracellulaire que ces récepteurs retournent au niveau du réseau trans-golgien.

Si la plupart des enzymes lysosomales sont adressées aux lysosomes de cette façon, il existe d'autres voies. C'est ainsi par exemple que le trafic des enzymes lysosomales dans les hépatocytes ou encore les leucocytes n'apparaît que faiblement perturbé, malgré une déficience de la phosphotransférase (Owada M. and Neufeld E. 1982). De même, la β -D-galactocérébrosidase n'utilise pas la voie d'adressage du recepteur Man-6-P pour rejoindre le lysosome (Van Weely *et al.* 1990). Citons le cas de la phosphatase acide ou des protéines LIMP et LAMP pour lesquelles le message d'adressage aux lysosomes est porté par des séquences peptidiques localisées au niveau de leur domaine cytoplasmique. (Peters *et al.* 1990). Enfin, Reczek *et al.* (2007) ont montré que la β -D-glucocérobrosidase est adressée au lysosome grâce à la protéine LIMP-2 avec laquelle elle s'associe de façon spécifique. En effet, ces auteurs ont montré qu'une déficience de la protéine LIMP-2 se traduit par une sécrétion de la β -D-glucocérobrosidase dans le milieu extracellulaire.

II-3. Les différentes maladies d'accumulation lysosomales

II-3-1 Les différentes causes

Les maladies d'accumulation lysosomales ou thésaurismoses, sont des maladies génétiques rares dont la transmission se fait sur le mode récessif et autosomique à l'exception des maladies de Hunter (MPS II), de Fabry (glycosphingolipidose) et de Danon (ou glycogénose), dont la transmission se fait sur le mode récessif lié au chromosome X. A ce jour, une quarantaine de LSD ont été recensées avec une fréquence moyenne d'apparition de 1/25000 (Clarke 2008).

Ces maladies ont en commun une déficience d'une des nombreuses protéines lysosomales impliquées dans le catabolisme des biomolécules. C'est ainsi que ces maladies peuvent avoir pour origine :



Enzyme 1 : UDP-N-acetylglucosamine:glycoprotein N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase Enzyme 2 : alpha-N-acetylglucosaminyl phosphodiesterase

Figure 16 : Adressage au lysosome des exoglycosidases par la voie du Mannose-6phosphate. Après transfert de l'exoglycosidase dans l'appareil de golgi, un ou plusieurs de ses *N*-glycanes de type oligomannosidique subissent l'action de l'enzyme 1 qui transfert un résidu de GlcNAc-1-phosphate sur le carbone 6 d'un résidu de Man. L'action de l'enzyme 2 permet l'hydrolyse de la liaison entre le résidu de GlcNAc et le phosphate qui reste lié au Man, conduisant ainsi à l'apparition d'un résidu de Mannose-6-phosphate qui sera reconnu par un récepteur au niveau du trans Golgi. Par une navette golgienne, l'ensemble est dirigé vers le lysosome. Après fusion avec ce dernier, le pH acide intralysosomal entraine la dissociation du récepteur et de l'exoglycosidase.

- l'absence totale d'une de ces protéines,
- la synthèse d'une protéine inactive,
- le mauvais adressage au lysosome (ex I cell disease),
- l'instabilité d'une protéine active dans le lysosome (ex la galactosialidose),
- l'absence d'une protéine activatrice ou stabilisatrice (cas des saposines),

- la déficience d'un gène codant une protéine, la FGE (Formylglycine Generating Enzyme) impliquée dans la modification post-traductionnelle d'un résidu de cystéine très conservé parmi les différentes sulfatases en un dérivé de formylglycine responsable de l'activité sulfatasique de ces enzymes (Schmidt *et al.* 1995),

- le transport anormal vers le lysosome (ex mucolipidose de type IV),

- la présence d'un inhibiteur naturel ou synthétique dans le lysosome (swainsonine, chloroquine....).

La plupart des enzymes lysosomales sont des exo-hydrolases qui agissent de façon séquentielle en partant de l'extrémité non réductrice des chaînes glycanniques à dégrader. Ainsi, si le dernier résidu d'une chaîne ne peut être enlevé pour une des raisons évoquées cidessus, la dégradation du reste de la chaîne est bloquée et le substrat s'accumule dans le lysosome.

II-3-2 Classification des LSD

La classification des LSD, sur la base des métabolites qui s'accumulent, n'est pas évidente car une même enzyme peut intervenir dans le catabolisme de plusieurs glycoconjugués (glycoprotéines, glycolipides, protéoglycannes). Néanmoins, elles sont classées en fonction de la nature des biomolécules affectées par le défaut de catabolisme et la nature des métabolites qui s'accumulent. A ce jour, 11 déficiences ont été recensées pour le catabolisme des mucopolysaccharides, 5 pour les glycoprotéines (Winchester *et al.* 1995; Michalski and Klein 1999), 8 pour les glycosphingolipides ; (Ginzburg *et al.* 2004) et 1 pour la dégradation du glycogène (Futerman and Van Meer 2004).

Le diagnostic des LSD peut être établi au cours de la grossesse, ou dès la naissance en mettant en œuvre des techniques biochimiques (caractérisation structurale des métabolites d'accumulation dans les urines par exemple), microscopiques (mise en évidence de vacuoles dans les cellules sanguines), et de biologie moléculaire (mise en évidence de mutation génétique). L'apparition de signes cliniques ultérieurs comme une déficience neurologique progressive, des anomalies de croissance (retard ou dysmorphie) ou encore une

organomégalie progressive (foie, rate, cœur), vient confirmer le diagnostic. Toutefois, il ne permet pas de préciser le type de LSD car, malgré les nombreux critères spécifiques de ces maladies, les manifestations cliniques sont souvent similaires (Warren and Alroy 2000). De plus, ils peuvent survenir à différents moments de la vie : dès la naissance, à l'adolescence ou encore à l'âge adulte. Plus l'apparition de ces signes est précoce, plus grave est la maladie. Ainsi, les formes infantiles sont gravissimes et se traduisent par des atteintes cérébrales et neurologiques qui conduisent à la mort des enfants au cours de leurs 2 premières années de vie. En parallèle, on observe une forte augmentation de la taille de certains organes en particulier le foie et la rate.

III- Les mucopolysaccharidoses

III-1 Structure des différents glycosaminoglycannes

Les mucopolysaccharidoses constituent une classe de maladies de surcharge lysosomale qui se caractérise par l'accumulation de chaînes oligosaccharidiques nommées glycosaminoglycannes ou mucopolysaccharides. Ces chaînes oligosaccharidiques, en association avec un squelette protéique, constituent une famille de glycoconjugués appelés les protéoglycannes.

L'une des caractéristiques structurales des glycosaminoglycannes (GAG) est la longueur de leur chaîne qui peut atteindre une centaine de monosaccharides organisés en unités disaccharidiques renfermant généralement un acide uronique et une osamine. Ce motif de base subit de nombreuses modifications, comme l'ajout de sulfates sur un groupement hydroxyl ou amine, des réactions de dé-*N*-acétylation, ou encore des réactions d'épimérisation du carbone 5 de l'acide glucuronique pour donner l'acide iduronique.

En fonction de ces différents paramètres structuraux et du mode d'ancrage de ces chaînes aux protéines, on distingue 5 classes de glycosaminoglycannes : les chondroïtines sulfates (CS), les dermatanes sulfates (DS), les kératanes sulfates (KS), les héparanes sulfates (HS) et l'acide hyaluronique. Cette dernière classe se distingue des 4 autres par le fait que la chaîne GAG n'est pas liée à une protéine et qu'elle n'est pas sulfatée. Pour ces raisons, nous ne la détaillerons pas davantage.

Pour chacune de ces classes, le mode d'ancrage à la protéine et la structure du motif disaccharidique ainsi que les modifications potentielles qu'il peut subir, sont présentés dans les figures 17 et 18.





 $X = H \text{ ou } CO-CH_3 \text{ ou } SO_3$ $Y = H \text{ ou } SO_3$

Figure 17 : **a**) Structure schématique d'une chaine d'héparane sulfate (cadre supérieur). Le cadre inférieur présente la structure développée de l'unité de répétition disaccharidique avec, à gauche, l'acide D-glucuronique, et à droite, l'acide L-iduronique comme acide uronique.

b) Structure schématique d'une chaine de dermatane sulfate (cadre supérieur). Le cadre inférieur présente la structure développée de l'unité de répétition disaccharidique avec, à gauche, l'acide D-glucuronique, et à droite, l'acide L-iduronique comme acide uronique.

Les différentes modifications que peuvent subir ces unités disaccharidiques sont représentées par les lettres X et Y.





Figure 18 : **a**) Structure schématique d'une chaine de chondroïtine sulfate (cadre supérieur). Le cadre inférieur présente la structure développée de l'unité de répétition disaccharidique.

b) Structure schématique d'une chaine de kératane sulfate (KS) (cadre supérieur) avec les différents types d'ancrage aux protéines. Le cadre inférieur présente la structure développée de l'unité de répétition disaccharidique.

Les différentes modifications que peuvent subir ces unités disaccharidiques sont représentées par la lettre Y.

Les héparanes et l'héparine (Fig. 17a) sont ancrées aux protéines grâce au tétra saccharide GlcUA β1-3 Gal β1-3 Gal β1-4 Xyl β1- sur un résidu de Ser ou Thr de la protéine. Sur le résidu GlcUA en position terminale non réductrice, viendront s'accrocher alternativement un résidu de GlcNAc suivi d'un acide glucuronique. Ce motif disaccharidique est répété entre 50 et 100 fois. Après synthèse, certains résidus d'acide glucuronique subiront une épimérisation de leur carbone 5 catalysée par la HS-C5 glucuronyl épimérase, pour générer l'acide iduronique. Les 2 types d'acides uroniques qui coexistent dans une chaîne HS seront retrouvés, soit sous leur forme non modifiée, soit sous leur forme sulfatée au niveau de leur carbone 2, suivant qu'il y a action ou non de la HS-2-O-sulfotransférase. Quant au résidu de GlcNAc, il est le siège de multiples réactions de modification. En effet, il pourra être dé-Nacétylé et rester sous la forme d'une glucosamine (Vanpouille et al. 2007). Néanmoins, dans la majorité des cas, la réaction de dé-N-acétylation est suivie de la réaction de sulfatation de la fonction amine. Ces 2 réactions sont catalysées par les N-desacétylase / N-sulfotranférase. La GlcNAc peut également être sulfatée sur son carbone 3 grâce à une HS-3-Osulfotransférase ou sur son carbone 6 grâce à une HS-6-O-sulfotransférase. L'ensemble de ces modifications génère donc une très grande hétérogénéité structurale. A ce jour, 23 unités disaccharidiques différentes ont été recensées (Esko and Lindahl 2001).

A cette hétérogénéité, il convient d'ajouter que l'on peut distinguer au sein d'une même chaîne HS, 3 domaines différents nommés NA pour les domaines faiblement sulfatés (on note une prépondérance de résidus GlcNAc), NS pour les domaines fortement sulfatés (la majorité des résidus de GlcNAc sont modifiés sous leur forme GlcNS), et NANS pour les domaines présentant une sulfatation intermédiaire. Il est à noter que l'héparine se différencie des héparanes sulfates par les faits suivants :

- elle est fabriquée uniquement par les mastocytes,

- elle est clivée rapidement de son squelette protéique pour se retrouver sous forme libre,

- l'étendue des modifications qu'elle subit est beaucoup plus importante que les HS puisque 85% des résidus de GlcNAc apparaissent dé-N-acétylés et N-sulfatés et qu'environ 70% des résidus de GlcA sont transformés en résidu IduA (Naimy *et al.* 2008).

Les dermatanes sulfates (DS) (Fig. 17b) et les chondroïtines sulfates (CS) (Fig. 18a) sont ancrés aux protéines par le même tétra saccharide que les HS. Les chaînes GAG sont constituées par l'alternance d'un acide uronique et d'un résidu de N-acetylgalactosamine. Pour les CS, le seul acide uronique est l'acide glucuronique, alors que dans les DS, l'acide uronique est majoritairement l'acide iduronique sous l'action de la CS/DS C5-glucuronyl épimérase. Les principales modifications qui affectent ces monosaccharides sont la sulfatation

sur les carbones 4 et/ou 6 du résidu de GalNAc et la sulfatation du carbone 2 du résidu IduA. Au regard de la sulfatation des résidus de GalNAc, la famille des CS peut être subdivisée en 3 sous-classes : les chondroïtines-6-sulfates majoritairement sulfatées sur le carbone 6, les chondroïtines-4-sulfates majoritairement sulfatées sur le carbone 4 et les mixtes.

La dernière grande famille de chaînes glycosaminoglycannes concerne les kératanes sulfates qui se distinguent des 4 chaînes précédentes par le fait que le disaccharide de répétition ne contient pas d'acide uronique mais un résidu de Gal à la place (Fig. 18b). L'autre changement structural notable est celui des modifications puisque la seule décrite à ce jour est la sulfatation du carbone 6 du résidu de Gal et de GlcNAc sous l'effet, respectivement de la KS Gal 6-O-sulfotransférase et de la KS GlcNAc 6-O-sulfotransférase. L'autre caractéristique majeure des KS concerne leur mode d'ancrage aux protéines. Aucune d'elle n'est ancrée par le tétra saccharide GlcA-Gal-Gal-Xyl. Au niveau de la cornée, les chaînes GAG, nommées KS de type I, sont liées aux protéines par l'intermédiaire du Gal terminal de l'antenne N-acetyllactosaminique, liée sur le Man de la branche α 1-6 du noyau penta-saccharidique décrit pour les N-glycannes. Au niveau des cartilages, l'ancrage des KS se fait directement par l'intermédiaire d'un résidu de GalNAc sur un résidu de Ser ou Thr.

III-2. Le catabolisme des chaînes GAG

III-2-1. Action des endo-glycosidases

La dégradation des protéoglycannes débute par le squelette protéique. Les chaînes GAG subissent ensuite une dégradation partielle dans l'endosome primaire pour conduire à des fragments de masse moléculaire d'environ 10KDa. Cette dégradation partielle se poursuit dans l'endosome tardif pour générer des fragments d'environ 5KDa. Deux classes d'endoglycosidases sont responsables de ces dégradations. Il s'agit des hyaluronidases (Kreil 1995), et des héparanases (Hulett *et al.* 1999 ; Bame *et al.* 2000). Les premières, nommées également endo- β -N-acetylhexosaminidases, coupent la liaison GalNAc (β 1-4) GlcA retrouvée dans l'acide hyaluronique, les CS et DS. Quant aux secondes, elles clivent des liaisons glucuronyls à l'intérieur des chaînes d'HS/héparine. D'autres endo-glycosidases ont également été reportées.

III-2-2. Action séquentielle des exo-glycosidases et exosulfatases

La dégradation de ces fragments se poursuit et s'achève dans le lysosome grâce à des exo-glycosidases qui agissent de façon récurrente depuis l'extrémité non-réductrice jusqu'à l'extrémité réductrice. L'absence ou la déficience de l'une d'entre elles entraîne un blocage du processus de dégradation de ces polymères qui vont alors s'accumuler. A ce jour, 11 exo-glycosidases nécessaires à la dégradation des GAG ont ainsi été impliqués dans un défaut de dégradation des GAG. Le tableau IV répertorie ces onze enzymes, le nom des pathologies qui s'y rapportent, ainsi que la nature du matériel oligosaccharidique qui s'accumule. Dans un souci de concision, nous ne développerons que le catabolisme des HS/héparine et DS qui sont les 2 GAG que l'on retrouve dans les mucopolysaccharidoses de type I (MPS-I).

Comme l'illustre la figure 19, la dégradation complète de toutes les unités disaccharidiques qui composent une molécule d'HS est de loin la plus complexe. Sept déficiences enzymatiques conduisant à une accumulation d'héparanes sulfates ont été répertoriées à ce jour, conduisant chacune à un syndrome parfaitement identifié (Tableau IV).

Le nombre de mutations recensées à ce jour pour chacun des gènes codant ces enzymes est parfois considérable. A titre d'exemple, on compte quelque 100 mutations différentes (<u>http://www.hgmd.org</u>) pour l' α -iduronidase. Néanmoins, parmi ces 100 mutations, 2, les mutations W402X et Q70X, représentent à elles seules 70% des mutations observées en Europe (Beesley *et al.* 2001). Comme cela est souvent le cas pour les LSD, on note une corrélation entre la sévérité des manifestations cliniques et le taux d'activité résiduelle de l'enzyme mutée, qui dépend elle-même de la mutation qui affecte le gène (Tieu 1995 ; Scott 1993).

IV-Principales perturbations métaboliques observées au cours de LSD

Comme nous l'avons mentionné précédemment, les LSD résultent le plus souvent d'une mutation dans le gène d'une hydrolase, la rendant partiellement ou totalement déficiente. Les multiples mutations génétiques conduisant aux différentes LSD, recensées à ce jour, ont été abondamment décrites (Gieselmann 1995), de même que la structure des métabolites incomplètement dégradés qui s'accumulent dans les cellules et que l'on retrouve dans les liquides d'excrétion comme les urines. Les efforts actuels portent sur les différentes stratégies thérapeutiques offertes pour le traitement de ces maladies et qui apparaissent pour la plupart très prometteuses. Néanmoins, entre ces 2 aspects, diagnostic et thérapie, les mécanismes

Maladies	Nom	Déficience Enzymatique	Réf. bibliographiques
MPS I	Hurler Hurler/Scheie	α-L-iduronidase E.C.3.2.1.76	Beesley <i>et al.</i> (2001) Tieu <i>et al.</i> (1995)
	Scheie		Scott <i>et al.</i> (1992)
MPS II	Hunter	iduronate-2-sulfatase E.C.3.1.6.13	Froissart et al. (2007)
MPS III A	Sanfilippo A	heparan-N-sulfatase EC 3.10.1.1	Blanch <i>et al.</i> (1997)
MPS IIIB	Sanfilippo B	α-Nacetylglucosaminidase	Weber <i>et al.</i> (1999)
MPS IIIC	Sanfilippo C	acetyl-coenzyme A (CoA):α- glucosaminide Nacetyltransferase EC 2.3.1.3	Ausseil et al. (2004)
MPS IIID	Sanfilippo D	N-acetylglucosamine-6-sulfatase E.C. 3.1.6.14	Beesley et al. (2003)
MPS IVA	Morquio A	N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase E.C. 3.1.6.4	Sukegawa et al. (2000)
MPS IVB	Morquio B	beta-galactosidase	Paschke et al. (2001)
MPS VI	Maroteaux-Lamy	N-acetylgalactosamine-4-sulfatase	Villani et al. (1999)
		E.C. 3.1.6.12	
MPS VII	Sly	β-glucuronidase EC 3.2.1.31	Tomatsu <i>et al</i> . (1991)
MPS IX	Natowicz	hyaluronidase 1	Triggs-Raine et al. (1999)

Tableau IV : Les différentes mucopolysaccharidoses.



В



Figure 19 : A) action séquentielle des différentes exoglycosidases et exosulfatases impliquées dans la dégradation de l'unité de répétition di-saccharidique **A**) d'une chaine d'héparane sulfate, **B**) d'une chaine de dermatane sulfate avec l'acide iduronique (partie gauche) ou l'acide glucuronique (partie droite).

Les enzymes sont écrites en caractère vert alors que le nom des pathologies s'y rapportant est écrit en rouge.

physiopathologiques qui conduisent aux nombreux symptômes observés chez les malades restent largement méconnus. Pendant longtemps, les désordres observés ont été imputés à l'augmentation du volume des cellules conduisant à l'augmentation du volume des organes comme le foie, rein, cœur etc., d'où leur dysfonctionnement. Néanmoins, les travaux d'Elleder sur la cardiomyopathie de patients atteints de la maladie de Fabry ont confirmé une augmentation importante du poids du cœur pouvant atteindre 1kg mais ont révélé que le poids du matériel d'accumulation, en l'occurrence du Gb3, ne représente que 5% du poids total. (Elleder 2003).

Cela amène à la conclusion que des désordres secondaires, liés à l'accumulation des oligosaccharides (considérée comme cause primaire de la physiopathologie des LSD), ont lieu dans les cellules atteintes. Plusieurs de ces effets ont été mentionnés dans la littérature. De façon non exhaustive, citons :

- des taux élevés de cytokines, chez de nombreux patients atteints de LSD, dus à l'activation anormale des macrophages (Hollack *et al.* 1997),

- une fréquence apoptotique anormalement élevée des chondrocytes articulaires due à une augmentation du taux d'oxyde nitrique (NO), consécutive à l'accumulation des fragments de dermatanes sulfates (Simonaro *et al.* 2001),

- une activité mitochondriale perturbée chez des patients atteints de la maladie de Batten et de la maladie de Fabry (Jolly *et al.* 2002 ; Lucke *et al.* 2004),

- ou encore des changements dans l'expression de très nombreux gènes comme ceux en relation avec des processus inflammatoires dans les maladies de Sandhoff et de Tay-Sachs ou encore dans le métabolisme des lipides dans un modèle murin de la maladie de Batten.

Dans leur excellente revue sur la biologie cellulaire des maladies d'accumulation lysosomale, Futerman et van Meer (2004) considèrent d'ailleurs que ces changements dans l'expression de certains gènes sont à l'origine d'un troisième niveau de causes du dérèglement cellulaire et tissulaire observés au cours des LSD.

Parmi les nombreux autres effets secondaires et tertiaires rapportés dans la littérature, il en est un qui a retenu tout particulièrement notre attention. Il s'agit de l'accumulation des glycosphingolipides de type GM2, GM3, observée dans différentes mucopolysaccharidoses pour lesquelles l'enzyme déficiente n'est en aucun cas impliquée dans la dégradation des glycosphingolipides (Siegel and Walkley 1994; Hara *et al.* 1984; Li *et al.* 1999).

Cette accumulation secondaire du GM2 et GM3 a été directement corrélée aux changements morphologiques et fonctionnels observés au niveau des neurones et expliquerait les troubles cérébraux et neurologiques observés chez les patients atteints de ces maladies. En

2001, les travaux de Liour et al. (2001) ont apporté un éclairage sur les causes possibles de l'augmentation de ces glycosphingolipides en utilisant comme modèle cellulaire la lignée P19 EC traitée par la suramine. Cette molécule, initialement utilisée dans le traitement de certaines maladies parasitaires, s'accumule dans les lysosomes et engendre une accumulation de glycosaminoglycannes et de glycosphingolipides, de façon similaire à celle observée dans les mucopolysaccharidoses (Constantopoulos *et al.* 1980 ; Russell *et al.* 2001).

En dosant l'activité *N*-acetylgalactosaminyl transférase et l'activité sialidase dans les cellules P19 EC traitées par la suramine, Liour *et al.* (2001) montrent une réduction significative de ces 2 activités. Ainsi, l'accumulation de chaînes glycosaminoglycannes dans les cellules interférerait à la fois sur la biosynthèse et la dégradation des glycosphingolipides, expliquant l'accumulation de GM2 et GM3. Pour expliquer l'impact observé sur la biosynthèse de ces molécules, les auteurs postulent pour un remaniement important des organites, en particulier du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi, dans des cellules accumulant des granules de hautes densités et des vacuoles (Jones *et al.* 1998; Russell *et al.* 1998).

V- Etude de la N- et O-glycosylation au cours de mucopolysaccharidoses de type I

A notre connaissance, aucune étude visant à caractériser la glycosylation des glycoprotéines sériques et cellulaires chez des patients atteints de LSD n'a été entreprise. Compte tenu de notre savoir-faire dans le domaine de la caractérisation structurale des chaînes glycanniques de glycoprotéines cellulaires ou sériques, nous comptons, dans un premier temps, comparer les glycomes sérique et cellulaire à partir de sérum et de fibroblastes isolés de patients sains et malades.

Le lysosome étant le premier organite cellulaire affecté au cours de ces maladies, nous envisageons, dans un second temps, d'établir par une approche glycoprotéomique, la cartographie des glycoprotéines de cet organite chez des sujets sains et malades, dans le but de mettre en évidence des changements susceptibles d'apporter un premier éclairage sur les mécanismes moléculaires conduisant aux désordres cellulaires et tissulaires observés au cours de cette maladie.

V-1 Choix de la pathologie étudiée

Nous avons choisi de porter nos efforts sur les MPS de type I qui, comme indiqué dans le tableau IV, sont dues à une déficience de l'alpha iduronidase chargée du clivage de la liaison osidique impliquant un acide iduronique en position terminale non réductrice. Au-delà de l'accumulation de chaînes d'héparanes sulfates et de dermatanes sulfates qui s'ensuit, nous avons mentionné une accumulation parallèle des gangliosides GM2, GM3 qui serait due à une modification des activités galactosyltransférase et sialidase, synonyme d'une modification probable des potentialités de glycosylation. Le troisième intérêt de cette pathologie est qu'elle se décline en 3 syndromes différents, suivant l'état de gravité. Le plus grave est le syndrome de Hurler, le moins grave le syndrome de Scheie avec entre les deux, le syndrome de Hurler/Scheie. A nos yeux, l'existence de ces 3 formes nous permettra de voir s'il existe une corrélation entre les changements quantitatifs et/ou qualitatifs de la N- et/ou O-glycosylation des glycoprotéines que nous espérons établir et les signes cliniques observés pour chacune des 3 formes décrites.

Pour visualiser ces éventuels changements, nous établirons tout d'abord le glycome sérique et cellulaire à partir de sérum et de fibroblastes de patients sains et atteints du syndrome de Hurler à des fins de comparaison. Nous établirons ensuite le glycoprotéome lysosomal, à partir de fibroblastes en culture prélevés chez des individus sains et atteints du syndrome de Hurler.

V-2 Etude du glycome cellulaire et sérique de patients atteints de MPS-I

V-2-1 Comparaison des glycomes sériques de patients sains vs patients atteints de MPS-I

Comme nous l'avons évoqué dans le chapitre consacré à l'établissement du glycome sérique, un nombre important de pathologies, en dehors de celles directement liées à un défaut de biosynthèse des glycannes des glycoprotéines (cas des CDG-I ou II), entraîne des changements de glycosylation des glycoprotéines, pouvant être utilisés comme des marqueurs diagnostiques ou pronostiques. Compte tenu de notre expérience dans ce domaine, nous entreprendrons dans un premier temps, l'étude du glycome sérique de patients clairement diagnostiqués pour le syndrome de Hurler selon la stratégie présentée dans le schéma III (page 59) et le comparerons avec celui établi pour des patients sains. Si des changements de glycosylation significatifs sont observés, nous élargirons cette étude à des patients atteints de syndrome de Hurler/Scheie et le syndrome de Scheie. Ces 2 formes représentant des formes atténuées du syndrome de Hurler, nous tenterons de voir si ces mêmes changements sont observés tant d'un point de vue quantitatif que qualitatif.

V-2-2 Comparaison des glycomes de fibroblastes de patients sains vs patients atteints de MPS-I.

En parallèle de l'étude précédente, nous comptons établir le glycome de fibroblastes isolés de patients atteints de MPS-I et le comparer avec celui de fibroblastes de patients sains.

Si cette étude apparaît similaire à celle évoquée dans le chapitre précédent, une étape supplémentaire visant à libérer les glycoprotéines membranaires sera nécessaire. Pour cela, après récupération des cellules en culture, soit par grattage ou par traitement à la trypsine en présence d'EDTA, celles-ci seront lavées abondamment par du PBS pour éliminer le sérum de veau fœtal. Le culot cellulaire sera ensuite traité par une solution de SDS, suivie d'un traitement thermique dont le but est de solubiliser les protéines membranaires. Pour permettre l'action de la PNGase, le SDS sera neutralisé par une solution de nonidet P40. A partir de cette étape, les N-glycannes seront récupérés comme présentés dans le chapitre précédent.

En fonction des résultats obtenus, cette étude pourra être élargie à la comparaison du glycome de différents fibroblastes isolés de patients atteints des différents types de MPS-I.

V-3 Etude du glycoprotéome lysosomal

Une telle étude comprend plusieurs étapes distinctes. La première consistera à préparer les lysosomes à partir de culture de fibroblastes de peau issus d'un individu sain (population témoin) et d'un patient atteint de la maladie de Hurler qui est la forme la plus grave des mucopolysaccharidoses de type I. En effet, il est logique de penser que les modifications du protéome et glycoprotéome seront les plus importantes dans cette forme la plus aigüe de la maladie. La seconde étape consistera à préparer les protéines et glycoprotéines solubles et membranaires des lysosomes ainsi purifiés. Dans une troisième étape, les protéines issues des 2 populations de lysosomes (sains versus malades) seront marquées spécifiquement avec deux types de marqueurs différents et clivées en peptides par coupures enzymatiques limitées. Après mélange des 2 populations de peptides, ceux-ci seront fractionnés par chromatographie liquide en phase inversée, couplée en ligne à un spectromètre de masse. La dernière étape consistera à repérer les peptides identiques (sur la base de leur structure primaire) présentant une variation quantitative significative et à les identifier.

V-3-1 Préparation des lysosomes

Il existe dans la littérature de nombreux protocoles opératoires pour la préparation de lysosome. Dans un premier essai, nous nous proposons d'utiliser celui utilisé par Schütt et al. (2002) lors de leur analyse du protéome de lysosomes issus de cellules RPE humaines en culture. Ces cellules, tout comme les fibroblastes, sont des cellules adhérentes qui arrêtent leur division dès lors qu'elles sont à confluence. Les différentes phases opératoires pour arriver aux lysosomes purifiés sont présentées dans le schéma 4. Brièvement, les cellules seront récupérées par un traitement à la trypsine. Après plusieurs lavages dans un tampon PBS pour éliminer les débris cellulaires et le sérum de veau fœtal, les cellules seront homogénéisées dans un appareil de Potter après les avoir suspendues dans un tampon renfermant du saccharose 250mM et des inhibiteurs de protéases. Une première centrifugation à faible vitesse permettra d'éliminer les cellules intactes ainsi que les noyaux. Le surnageant post-nucléaire renfermant les autres organites sera déposé à la surface d'un mélange de densité croissante, depuis le haut jusqu'au bas du tube à centrifuger, composé de Percoll à 6%, d'une solution de métrizamide à 20% et enfin d'une solution de métrizamide à 40%. Une centrifugation de 15 min à 50000g permettra de récupérer les lysosomes à l'interface des solutions de métrizamide à 20 et 40%.

Il conviendra de vérifier, à partir de cette fraction, l'intégrité des lysosomes en mesurant par exemple l'activité N-acetylglucosaminidase, avant et après traitement au triton X100. Il conviendra également d'évaluer la pureté de cette fraction en testant :

- l'activité enzymatique de la succinyl deshydrogenase (EC1.3.99.1) témoin de la présence de mitochondries,

- l'activité de l'UDP Galactosyltransférase témoin d'une contamination par des microsomes d'origine golgienne,

- l'activité catalase spécifique de la présence de peroxysomes.

La pureté des préparations lysosomales pourra également être entreprise par électrophorèse PAGE des protéines totales, suivie d'une étape de western blot sur une membrane de nitrocellulose ou de PVDF, suivie d'une immunorévélation en utilisant des anticorps anti LAMP-2, spécifique du lysosome, anti-catalase ou anti HSP 70 (spécifique de



Schéma 4 : Protocole de préparation des lysosomes de fibroblastes humains.

Après récupération et homogénéisation des fibroblastes de peau en culture, une 1^{ère} centrifugation permettra d'éliminer les noyaux. Les lysosomes du surnageant seront préparés par centrifugation sur gradient de métrizamide. Si la fraction lysosomique apparaît suffisamment pure (A), une étude glycomique et glycoprotéique sera entreprise. Dans un cas moins favorable (B) liée à une grande hétérogénéité de la fraction lysosomique, un traitemant à la méthionine méthyl estérifiée sera entrepris dans le but de lyser spécifiquement les lysosomes. Les études glycomiques et glycoprotéomiques seront réalisées à partir du surnageant obtenu après élimination des organelles non lysosomiques.

la mitochondrie), anti GRP 78 (spécifique du réticulum endoplasmique) et anti Na⁺K⁺-ATPase (spécifique de la membrane cytoplasmique) (Schoer *et al.* 2000).

La principale crainte liée à cette étape de préparation des lysosomes est celle concernant la densité des lysosomes isolés de cellules de patient atteint de la maladie de Hurler. En effet, comme nous l'avons mentionné dans les paragraphes précédents, la caractéristique des LSD est de conduire à un « engorgement » des lysosomes. Cela se traduit par un volume important de ces derniers et on peut s'attendre à une forte hétérogénéité de taille, donc de densité, des lysosomes. Ainsi, ces lysosomes risquent de se répartir de façon très diffuse dans les différentes couches du gradient de densité utilisé lors de la deuxième étape de centrifugation. Les différents tests de caractérisation des lysosomes énoncés ci-dessus permettront alors de repérer les fractions du gradient les plus riches en lysosomes. Une solution alternative pourrait consister à utiliser sur une fraction lysosomale pré-enrichie de la méthionine méthyl estérifiée qui a pour effet de rompre spécifiquement la membrane des lysosomes (Schröder *et al.* 2007). Ainsi, après centrifugation, les protéines solubles du lysosome ainsi que les fragments membranaires issus des lysosomes sont récupérés dans le surnageant. Cette approche pourrait ainsi s'avérer intéressante si des fractions suffisamment pures en lysosomes ne pouvaient être obtenues à partir de cellules de patients malades.

V-3-2 Comparaison du glycoprotéome de lysosomes sains vs lysosomes de fibroblastes atteints de MPS-I

La première étape dans l'établissement d'un glycoprotéome est celle de la préparation des glycoprotéines en utilisant comme élément de sélection leurs glycannes. Deux grandes stratégies sont actuellement utilisées. La première dite 'Top-Down' consiste à piéger les glycoprotéines entières en utilisant des lectines (Wu *et al.* 2008 ; Kaji *et al.* 2003) ou en les immobilisant sur des billes de silices fonctionnalisées avec des groupements hydrazine (Zhang *et al.* 2003; Pan *et al.* 2006). La seconde dite 'Bottom-up' consiste à préparer l'ensemble des protéines et glycoprotéines contenues dans l'échantillon, de générer des peptides et glycopeptides par hydrolyse enzymatique limitée et de piéger, par les mêmes procédés énoncés ci-dessus, les glycopeptides (Atwood 3rd *et al.* 2006; Kaji *et al.* 2006; Qiu and Regnier 2005b; Fan et al. 2005).

Les lectines peuvent être classées en deux catégories au regard de leur spécificité :
- celles dont le spectre de spécificité est étroit et qui peuvent s'avérer très utiles pour la recherche de variations structurales particulières comme par exemple la sialylation ou la fucosylation,

- celles dont le spectre de spécificités est large, permettant de piéger un plus grand nombre de glycoprotéines présentant différents motifs de glycosylation.

Dans un contexte de glycoprotéomique, une seule lectine peut être utilisée ou au contraire plusieurs, soit en mélange dans la stratégie dite 'multi-lectin affinity chromatography' ou les unes après les autres dans la stratégie nommée 'serial lectin affinity chromatography'.

Dans le but d'établir l'impact que peut engendrer l'accumulation de fragments héparanes sulfates et dermatanes sulfates rencontrés au cours de la maladie de Hurler sur la glycosylation, nous comptons, à partir des 2 fractions lysosomales préparées comme précédemment (saines versus MPS-I), procéder de la façon suivante :

- extraction et solubilisation des protéines et glycoprotéines membranaires en présence d'un détergent, suivie d'une réduction et alkylation des cystéines,

- dessalage des protéines et glycoprotéines par dialyse.

- hydrolyse des protéines et glycoprotéines par la trypsine de façon à générer des peptides et glycopeptides,

- piégeage des glycopeptides sur des lectines immobilisées. Notre souhait étant d'avoir une image du glycoprotéome la plus large possible, nous utiliserons comme lectines la Con A qui permet de piéger les N-glycannes renfermant des résidus de Man, de Glc et de Gal. Rappelons que la plupart des hydrolases sont adressées aux lysosomes grâce à un ou deux résidus de Man6-P présent(s) sur un N-glycanne de type oligomannosidique. De plus, dans la mesure où plusieurs hypothèses ont été formulées pour expliquer l'accumulation de gangliosides chez des patients atteints de MPS-I (Jones *et al.* 1998) comme des remaniements importants des organites cellulaires tels le réticulum endoplasmique et/ou l'appareil de Golgi, nous comptons utiliser d'autres lectines comme par exemple la WGA qui reconnaît le GlcNAc dans des N glycannes de type complexes et hybrides, la SNA qui reconnaît les acides sialiques liés en α 2-6 ou encore la LCA spécifique des résidus de Fucose. Les quatre colonnes de lectines immobilisées sur la première colonne de lectines sera déposée sur la seconde colonne et ainsi de suite afin d'obtenir une séparation maximale des différents glycannes.

- Elution des glycopeptides retenus sur les 4 colonnes d'affinité,

- libération des glycannes par la PNGase et récupération des peptides déglycosylés. Afin de pouvoir établir le glycoprotéome comparatif de lysosomes de fibroblastes sains versus lysosomes de fibroblastes MPS-I, nous réaliserons la libération des N-glycannes de 2 façons différentes. Dans le cas des fibroblastes sains, nous mènerons cette étape en présence d'H₂¹⁶O, alors que dans le cas des fibroblastes MPS-I, nous la mènerons en présence d'H₂¹⁸O.

- mélange des peptides déglycosylés issus des fibroblastes sains avec ceux issus de fibroblastes MPS-I,

- purification des peptides déglycosylés par chromatographie en phase inverse, couplée en ligne à un spectre de masse de type ES-MS-MS afin d'obtenir le rapport quantitatif de 2 peptides différents l'un de l'autre de 2 u.m.a. (¹⁶O versus ¹⁸O). Les couples de peptides dont le rapport quantitatif dépassera une valeur-seuil que nous fixerons au regard des résultats, seront fragmentés dans la cellule de collision du spectromètre de masse afin d'obtenir leur structure primaire et permettre ainsi d'identifier la glycoprotéine d'origine.

V-4 Conclusion

Les mécanismes physiopathologiques des maladies d'accumulation lysosomales qui sont des maladies multi-systémiques, sont à ce jour encore largement méconnus. L'accumulation des gangliosides GM2 et GM3 au cours de mucopolysaccharidoses (dont celles de types I) montre que la machinerie de glycosylation, tant du point de vue de la biosynthèse que du point de vue du catabolisme, est affectée. Nous espérons que nos travaux permettront de mettre en évidence d'autres perturbations de nature glycannique qui pourraient apporter certains éclairages sur les causes des troubles observés. Notre étude s'inscrit dans le même esprit que celle de Ginzburg *et al.* (2004) qui ont étudié l'influence de l'accumulation de gangliosides lors de glycosphingolipidoses sur le métabolisme calcique. Ils ont ainsi mis en lumière plusieurs modifications susceptibles d'expliquer certains des troubles neurologiques observés dans ces pathologies.

Plusieurs approches thérapeutiques très prometteuses, visant à corriger le déficit enzymatique primaire des LSD, sont en cours d'études (thérapie génique, injection intraveineuse de l'enzyme déficiente, transplantation de cellules hématopoïétiques, ralentissement de la biosynthèse des molécules d'accumulation). Néanmoins, il est également nécessaire de disposer d'autres thérapies pour corriger les défauts secondaires engendrés lors de ces maladies et qui sont responsables de troubles graves. Il est indispensable d'identifier ces défauts secondaires avec précision afin d'élaborer les approches thérapeutiques les plus adaptées.

Enfin, nous avons souligné dans les pages précédentes, l'intérêt que revêtent les cellules de patients atteints de CDG dans l'exploration des voies métaboliques impliquées dans la biosynthèse des N-glycannes. Nous pensons, en entreprenant ces travaux, que les cellules de patients atteints de MPS pourront également apporter d'autres éclairages dans le métabolisme des glycoconjugués.

BIBLIOGRAPHIE

A

Abbott K.L., Aoki K., Lim J.M., Porterfield M., Johnson R., O'Regan R.M., Wells L., Tiemever M. and Pierce M. (2008). Targeted glycoproteomic identification of biomarkers for human breast carcinoma. J. Proteome Res., 7, pp 1470-1480.

Akama K., Oka S., Tobita T. and Hayashi H., (1994) The amino acid sequence of a boar transition protein 3. J. Biochem., 115, pp 58-65.

Akama K., Ichimura H., Sato H., Kojima S., Miura K., Hayashi H., Komatsu Y. and Nakano M., (1995) The amino acid sequence and interaction with the nucleosome core DNA of transition protein 4 from boar late spermatid nuclei. Eur. J. Biochem., 233, pp 179-185.

Allan J., Hartman P.G., Crane-Robinson C. and Aviles F.X., (1980) The structure of histone H1 and its location in chromatin. Nature, 288, pp 675-679.

Allen A.C., Bailey E.M., Brenchley P.E., Buck K.S., Barratt J. and Feehally J., (2001) Mesangial IgA1 in IgA nephropathy exhibits aberrant O-glycosylation: observations in three patients.

Kidney Int., 60, pp 969-973.

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

Atwood J.A. 3rd, Minning T., Ludolf F., Nuccio A., Weatherly D.B., Alvarez-Manilla G., Tarleton R. and Orlando R., (2006) Glycoproteomics of Trypanosoma cruzi trypomastigotes using subcellular fractionation, lectin affinity, and stable isotope labeling. J. Proteome Res., 5, pp 3376-3384.

Ausseil J., Loredo-Osti J.C., Verner A., Darmond-Zwaig C., Maire I., Poorthuis B., van Diggelen O.P., Hudson T.J., Fujiwara T.M., Morgan K. and Pshezhetsky A.V., (2004) Localisation of a gene for mucopolysaccharidosis IIIC to the pericentromeric region of chromosome 8.

J. Med. Genet., 41, pp 941-945.

B

Bainton D.F., (1981) The discovery of lysosomes. J. Cell. Biol., **91**, pp 66s-76s.

Bame K.J., Venkatesan I., Stelling H.D. and Tumova S., (2000) The spacing of S-domains on HS glycosaminoglycans determines whether the chain is a substrate for intracellular heparanases. Glycobiology., **10**, pp 715-726.

Bause E., (1983)Structural requirements of N-glycosylation of proteins. Studies with proline peptides as conformational probes.Biochem. J., 209, pp 331-336.

Beesley C.E., Meaney C.A., Greenland G., Adams V., Vellodi A., Young E.P. and Winchester B.G., (2001)
Mutational analysis of 85 mucopolysaccharidosis type I families: frequency of known mutations, identification of 17 novel mutations and in vitro expression of missense mutations.
Hum. Genet., **109**, pp 503-511.

Beesley C.E., Burke D., Jackson M., Vellodi A., Winchester B.G. and Young E.P., (2003) Sanfilippo syndrome type D: identification of the first mutation in the N-acetylglucosamine-6-sulphatase gene.

J. Med. Genet., 40, pp 192-194.

Blanch L., Weber B., Guo X.H., Scott H.S. and Hopwood J.J., (1997) Molecular defects in Sanfilippo syndrome type A. Hum. Mol. Genet., **6**, pp 787-791.

Bonifacino J.S. and Weissman A.M., (1998) Ubiquitin and the control of protein fate in the secretory and endocytic pathways. Annu. Rev. Cell. Dev. Biol., **14**, pp 19-57.

Briones P., Vilaseca M.A., García-Silva M.T., Pineda M., Colomer J., Ferrer I., Artigas J.,
Jaeken J. and Chabás A., (2001)
Congenital disorders of glycosylation (CDG) may be underdiagnosed when mimicking mitochondrial disease.
Eur. J. Paediatr. Neurol., 5, pp 127-131.

Brock J.H., (2002) The physiology of lactoferrin. Biochem. Cell. Biol., **80**, pp 1-6.

Buck C.A., Glick M.C. and Warren L., (1971) Glycopeptides from the surface of control and virus-transformed cells. Science., **172**, pp 169-171.

С

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

Callewaert N., Van Vlierberghe H., Van Hecke A., Laroy W., Delanghe J. and Contreras R., (2004)

Noninvasive diagnosis of liver cirrhosis using DNA sequencer-based total serum protein glycomics.

Nat. Med., 10, pp 429-434.

Chantret I., Dupré T., Delenda C., Bucher S., Dancourt J., Barnier A., Charollais A., Heron D., Bader-Meunier B., Danos O., Seta N., Durand G., Oriol R., Codogno P. and Moore S.E., (2002)

Congenital disorders of glycosylation type Ig is defined by a deficiency in dolichyl-Pmannose:Man7GlcNAc2-PP-dolichyl mannosyltransferase. J. Biol. Chem., **277**, pp 25815-25822.

Chantret I., Dancourt J., Dupré T., Delenda C., Bucher S., Vuillaumier-Barrot S., Ogier de Baulny H., Peletan C., Danos O., Seta N., Durand G., Oriol R., Codogno P. and Moore S.E., (2003) A deficiency in dolichyl-P-glucose:Glc1Man9GlcNAc2-PP-dolichyl alpha3glucosyltransferase defines a new subtype of congenital disorders of glycosylation.

J. Biol. Chem., **278**, pp 9962-9971.

Chirat F., Martinage A., Briand G., Kouach M., Van Dorsselaer A., Loir M., and Sautiere P., (1991)

Nuclear transition protein 1 from ram elongating spermatids. Mass spectrometric characterization, primary structure and phosphorylation sites of two variants. Eur. J.Biochem., **198**, pp 13-20.

Clarke L.A., (2008) The mucopolysaccharidoses: a success of molecular medicine. Expert Rev. Mol. Med., **10**, pp 1-18.

Coddeville B., Strecker G., Wieruszeski J.M., Vliegenthart J.F., van Halbeek H., Peter-Katalinić J., Egge H. and Spik G., (1992) Heterogeneity of bovine lactotransferrin glycans. Characterization of alpha-D-Galp-(1-->3)beta-D-Gal- and alpha-NeuAc-(2-->6)-beta-D-GalpNAc-(1-->4)- beta-D-GlcNAc-substituted N-linked glycans. Carbohydr. Res., **236**, pp 145-164.

Cointe D., Leroy Y. and Chirat F., (1998) Determination of the sialylation level and of the ratio alpha-(2-->3)/alpha-(2-->6) sialyl linkages of N-glycans by methylation and GC/MS analysis. Carbohydr. Res., **311**, pp 51-59. Cole K.D. and Kistler W.S., (1987) Nuclear transition protein 2 (TP2) of mammalian spermatids has a very basic carboxyl terminal domain. Biochem. Biophys. Res. Commun., **147**, pp 437-442.

Constantopoulos G., Rees S., Cragg B.G., Barranger J.A. and Brady R.O., (1980) Experimental animal model for mucopolysaccharidosis: suramin-induced glycosaminoglycan and sphingolipid accumulation in the rat. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., **77**, pp 3700-3704.

D

De Praeter C.M., Gerwig G.J., Bause E., Nuytinck L.K., Vliegenthart J.F., Breuer W., Kamerling J.P., Espeel M.F., Martin J.J., De Paepe A.M., Chan N.W., Dacremont G.A. and Van Coster R.N., (2000) A novel disorder caused by defective biosynthesis of N-linked oligosaccharides due to glucosidase I deficiency. Am. J. Hum. Genet., **66**, pp 1744-1456.

Denecke J., Kranz C., Kemming D., Koch H.G. and Marquardt T., (2004) An activated 5' cryptic splice site in the human ALG3 gene generates a premature termination codon insensitive to nonsense-mediated mRNA decay in a new case of congenital disorder of glycosylation type Id (CDG-Id). Hum. Mutat., **23**, pp 477-486.

Dennis J.W., Granovsky M. and Warren C.E., (1999) Glycoprotein glycosylation and cancer progression. Biochim. Biophys. Acta., **1473**, pp 21-34.

Deres K., Schild H., Wiesmüller K.H., Jung G. and Rammensee H.G., (1989) In vivo priming of virus-specific cytotoxic T lymphocytes with synthetic lipopeptide vaccine. Nature., **342**, pp 561-564.

Dube D.H. and Bertozzi C.R., (2005) Glycans in cancer and inflammation--potential for therapeutics and diagnostics. Nat. Rev. Drug. Discov., **4**, pp 477-188.

Dupressoir T., Sautière P., Lanneau M. and Loir M., (1985) Isolation and characterization of the ram spermatidal nuclear proteins P1, 3 and T. Exp. Cell. Res., **161**, pp 63-74.

Duvet S., Labiau O., Mir A.M., Kmiécik D., Krag S.S., Verbert A. and Cacan R., (1998) Cytosolic deglycosylation process of newly synthesized glycoproteins generates oligomannosides possessing one GlcNAc residue at the reducing end. Biochem. J., **335**, pp 389-396.

Duvet S., Dubuisson J., Ermonval M., Cacan R. and Verbert A., (1999) Retention and degradation of N-glycoproteins in the rough endoplasmic reticulum. Biosci. Rep., **19**, pp 491-498.

E

Eickbush T.H. and Moudrianakis E.N., (1978) The histone core complex: an octamer assembled by two sets of protein-protein interactions. Biochemistry, **17**, pp 4955-4964.

Eklund E.A. and Freeze H.H., (2006) The congenital disorders of glycosylation: a multifaceted group of syndromes. NeuroRx., **3**, pp 254-263.

Elleder M., (2003) Sequelae of storage in Fabry disease--pathology and comparison with other lysosomal storage diseases. Acta Paediatr. Suppl., **92**, pp 46-53.

Ermonval M., Cacan R., Gorgas K., Haas I.G., Verbert A. and Buttin G., (1997) Differential fate of glycoproteins carrying a monoglucosylated form of truncated N-glycan in a new CHO line, MadIA214214, selected for a thermosensitive secretory defect. J. Cell. Sci., **110**, pp 323-336.

Ermonval M., Duvet S., Zonneveld D., Cacan R., Buttin G. and Braakman I., (2000) Truncated N-glycans affect protein folding in the ER of CHO-derived mutant cell lines without preventing calnexin binding. Glycobiology, **10**, pp 77-87.

Esko J.D. and Lindahl U., (2001) Molecular diversity of heparan sulfate. J. Clin. Invest., **108**, pp 169-173.

F

Fan X., She Y.M., Bagshaw R.D., Callahan J.W., Schachter H. and Mahuran D.J., (2004) A method for proteomic identification of membrane-bound proteins containing Asn-linked oligosaccharides.

Anal. Biochem., **332**, pp 178-186.

Flögel M., Lauc G., Gornik I. and Macek B., (1998) Fucosylation and galactosylation of IgG heavy chains differ between acute and remission phases of juvenile chronic arthritis. Clin. Chem. Lab. Med., **36**, pp 99-102.

Foulquier F., Vasile E., Schollen E., Callewaert N., Raemaekers T., Quelhas D., Jaeken J., Mills P., Winchester B., Krieger M., Annaert W. and Matthijs G., (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**, pp 3764-3769. Foulquier F., Ungar D., Reynders E., Zeevaert R., Mills P., García-Silva M.T., Briones P., Winchester B., Morelle W., Krieger M., Annaert W. and Matthijs G., (2007) A new inborn error of glycosylation due to a Cog8 deficiency reveals a critical role for the Cog1-Cog8 interaction in COG complex formation. Hum. Mol. Genet., **16**, pp 717-730.

Frank C.G., Grubenmann C.E., Eyaid W., Berger E.G., Aebi M. and Hennet T., (2004) Identification and functional analysis of a defect in the human ALG9 gene: definition of congenital disorder of glycosylation type IL. Am. J. Hum. Genet., **75**, pp 146-150.

Froissart R., Da Silva I.M. and Maire I., (2007) Mucopolysaccharidosis type II: an update on mutation spectrum. Acta Paediatr. Suppl., **96**, pp 71-77.

Fujimura T., Shinohara Y., Tissot B., Pang P.C., Kurogochi M., Saito S., Arai Y., Sadilek M., Murayama K., Dell A., Nishimura S. and Hakomori S.I., (2008)
Glycosylation status of haptoglobin in sera of patients with prostate cancer vs. benign prostate disease or normal subjects.
Int. J. Cancer., 122, pp 39-49.

Futerman A.H. and van Meer G., (2004) The cell biology of lysosomal storage disorders. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol., **5**, pp 554-565.

G

Gahery H., Choppin J., Bourgault I., Fischer E., Maillère B. and Guillet J.G., (2005) HIV preventive vaccine research at the ANRS: the lipopeptide vaccine approach. Therapie, **60**, pp 243-248.

Gemmill T.R. and Trimble R.B., (1999) Overview of N- and O-linked oligosaccharide structures found in various yeast species. Biochim. Biophys. Acta., **1426**, pp 227-237.

Gerngross T.U., (2004) Advances in the production of human therapeutic proteins in yeasts and filamentous fungi. Nat. Biotechnol., **22**, pp 1409-1414.

Gieselmann V., (1995) Lysosomal storage diseases. Biochim. Biophys. Acta., **1270**, pp 103-136.

Ginzburg L., Kacher Y. and Futerman A.H., (2004) The pathogenesis of glycosphingolipid storage disorders. Semin. Cell. Dev. Biol., **15**, pp 417-431. Gras-Masse H., (2001) Single-chain lipopeptide vaccines for the induction of virus-specific cytotoxic T cell responses in randomly selected populations. Mol. Immunol., **38**, pp 423-431.

Grimes S.R. Jr., Meistrich M.L., Platz R.D. and Hnilica L.S., (1977) Nuclear protein transitions in rat testis spermatids. Exp. Cell Res., **110**, pp 31-39.

Grimes S.R. and Smart P.G., (1985) Changes in the structural organization of chromatin during spermatogenesis in the rat. Biochim. Biophys. Acta., **824**, pp128-139.

Grubenmann C.E., Frank C.G., Hülsmeier A.J., Schollen E., Matthijs G., Mayatepek E., Berger E.G., Aebi M. and Hennet T., (2004) Deficiency of the first mannosylation step in the N-glycosylation pathway causes congenital disorder of glycosylation type Ik. Hum. Mol. Genet.,**13**, pp 535-542.

H

Haeuptle M.A., Pujol F.M., Neupert C., Winchester B., Kastaniotis A.J., Aebi M. and Hennet T., (2008) Human RFT1 deficiency leads to a disorder of N-linked glycosylation. Am. J. Hum. Genet., **82**, pp 600-606.

Hamilton S.R., Davidson R.C., Sethuraman N., Nett J.H., Jiang Y., Rios S., Bobrowicz P., Stadheim T.A., Li H., Choi B.K., Hopkins D., Wischnewski H., Roser J., Mitchell T., Strawbridge R.R., Hoopes J., Wildt S. and Gerngross T.U., (2006) Humanization of yeast to produce complex terminally sialylated glycoproteins. Science, **313**, pp 1441-1443.

Hansske B., Thiel C., Lübke T., Hasilik M., Höning S., Peters V., Heidemann P.H., Hoffmann G.F., Berger E.G., von Figura K. and Körner C., (2002) Deficiency of UDP-galactose:N-acetylglucosamine beta-1,4-galactosyltransferase I causes the congenital disorder of glycosylation type IId. J. Clin. Invest., **109**, pp 725-733.

Hara A., Kitazawa N. and Taketomi T., (1984) Abnormalities of glycosphingolipids in mucopolysaccharidosis type III B. J. Lipid Res., **25**, pp 175-184.

Harrison R.L. and Jarvis D.L., (2006) Protein N-glycosylation in the baculovirus-insect cell expression system and engineering of insect cells to produce "mammalianized" recombinant glycoproteins. Adv. Virus Res., **68**, pp 159-191. Hart G.W., Brew K., Grant G.A., Bradshaw R.A. and Lennarz W.J., (1979) Primary structural requirements for the enzymatic formation of the N-glycosidic bond in glycoproteins. Studies with natural and synthetic peptides. J. Biol. Chem., **254**, pp 9747-9753.

Harvey D.J., (2005) Structural determination of N-linked glycans by matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization mass spectrometry. Proteomics, **5**, pp 1774-1786.

Hashii N., Kawasaki N., Itoh S., Hyuga M., Kawanishi T. and Hayakawa T., (2005) Glycomic/glycoproteomic analysis by liquid chromatography/mass spectrometry: analysis of glycan structural alteration in cells. Proteomics, **5**, pp 4665-4672.

Helander A., Eriksson G., Stibler H. and Jeppsson J.O., (2001) Interference of transferrin isoform types with carbohydrate-deficient transferrin quantification in the identification of alcohol abuse. Clin. Chem., **47**, pp 1225-1233.

Helenius A. and Aebi M., (2001) Intracellular functions of N-linked glycans. Science, **291**, pp 2364-2369.

Helenius J. and Aebi M., (2002a) Transmembrane movement of dolichol linked carbohydrates during N-glycoprotein biosynthesis in the endoplasmic reticulum. Semin. Cell. Dev. Biol., **13**, 171-178.

Helenius J., Ng D.T., Marolda C.L., Walter P., Valvano M.A. and Aebi M., (2002b) Translocation of lipid-linked oligosaccharides across the ER membrane requires Rft1 protein. Nature, **415**, pp 447-450.

Helenius A. and Aebi M., (2004) Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. Annu. Rev. Biochem., **73**, pp 1019-1049.

Hickman S. and Neufeld E.F., (1972) A hypothesis for I-cell disease: defective hydrolases that do not enter lysosomes. Biochem. Biophys. Res. Commun., **49**, pp 992-999.

Hollak C.E., Evers L., Aerts J.M. and van Oers M.H., (1997) Elevated levels of M-CSF, sCD14 and IL8 in type 1 Gaucher disease. Blood Cells Mol. Dis., **23**, pp 201-212.

Hounsell E.F. and Feizi T, (1982) Gastrointestinal mucins. Structures and antigenicities of their carbohydrate chains in health and disease. Med. Biol., **60**, pp 227-236. Hulett M.D., Freeman C., Hamdorf B.J., Baker R.T., Harris M.J. and Parish C.R., (1999) Cloning of mammalian heparanase, an important enzyme in tumor invasion and metastasis. Nat. Med., **5**, pp 803-809.

I

Imbach T., Schenk B., Schollen E., Burda P., Stutz A., Grunewald S., Bailie N.M., King M.D., Jaeken J., Matthijs G., Berger E.G., Aebi M. and Hennet T., (2000) Deficiency of dolichol-phosphate-mannose synthase-1 causes congenital disorder of glycosylation type Ie. J. Clin. Invest., **105**, pp 233-239.

J

Jackson P., (1990)

The use of polyacrylamide-gel electrophoresis for the high-resolution separation of reducing saccharides labelled with the fluorophore 8-aminonaphthalene-1,3,6-trisulphonic acid. Detection of picomolar quantities by an imaging system based on a cooled charge-coupled device.

Biochem. J., 270, pp 705-713.

Jaeken J., Schachter H., Carchon H., De Cock P., Coddeville B. and Spik G., (1994) Carbohydrate deficient glycoprotein syndrome type II: a deficiency in Golgi localised Nacetyl-glucosaminyltransferase II. Arch. Dis. Child., **71**, pp 123-127.

Jaeken J. and Matthijs G., (2007) Congenital disorders of glycosylation: a rapidly expanding disease family. Annu. Rev. Genomics Hum. Genet., **8**, pp 261-278.

Jolly R.D., Brown S., Das A.M. and Walkley S.U., (2002) Mitochondrial dysfunction in the neuronal ceroid-lipofuscinoses (Batten disease). Neurochem. Int., **40**, pp 565-571.

Jones M.Z., Alroy J., Boyer P.J., Cavanagh K.T., Johnson K., Gage D., Vorro J., Render J.A., Common R.S., Leedle R.A., Lowrie C., Sharp P., Liour S.S., Levene B., Hoard H., Lucas R. and Hopwood J.J., (1998) Caprine mucopolysaccharidosis-IIID: clinical, biochemical, morphological and immunohistochemical characteristics. J. Neuropathol. Exp. Neurol., **57**, pp 148-157.

Joshi L. and Lopez L.C., (2005) Bioprospecting in plants for engineered proteins. Curr. Opin. Plant Biol., **8**, pp 223-226.

K

Kaji H., Saito H., Yamauchi Y., Shinkawa T., Taoka M., Hirabayashi J., Kasai K., Takahashi N. and Isobe T., (2003)

Lectin affinity capture, isotope-coded tagging and mass spectrometry to identify N-linked glycoproteins.

Nat. Biotechnol., 21, pp 667-672.

Kaji H., Yamauchi Y., Takahashi N. and Isobe T., (2006) Mass spectrometric identification of N-linked glycopeptides using lectin-mediated affinity capture and glycosylation site-specific stable isotope tagging. Nat. Protoc., **1**, pp 3019-3027.

Kean E.L., (1991)

Topographical orientation in microsomal vesicles of the N-acetylglucosaminyltransferases which catalyze the biosynthesis of N-acetylglucosaminylpyrophosphoryldolichol and N-acetylglucosaminyl-N-acetylglucosaminylpyrophosphoryldolichol. J. Biol. Chem., **266**, pp 942-946.

Kim S., Westphal V., Srikrishna G., Mehta D.P., Peterson S., Filiano J., Karnes P.S., Patterson M.C. and Freeze H.H., (2000) Dolichol phosphate mannose synthase (DPM1) mutations define congenital disorder of glycosylation Ie (CDG-Ie). J. Clin. Invest., **105**, pp 191-198.

Kistler W.S., Noyes C., Hsu R. and Heinrikson R.L., (1975) The amino acid sequence of a testis-specific basic protein that is associated with spermatogenesis. J. Biol. Chem., **250**, pp 1847-1853.

Kochanowski N., Blanchard F., Cacan R., **Chirat** F., Guedon E., Marc A., Goergen J.L., (2006) Intracellular nucleotide and nucleotide sugar contents of cultured CHO cells determined by a fast, sensitive, and high-resolution ion-pair RP-HPLC. Anal Biochem., **348**, 243-251.

Körner C., Knauer R., Holzbach U., Hanefeld F., Lehle L. and von Figura K., (1998) Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type V: deficiency of dolichyl-P-Glc:Man9GlcNAc2-PP-dolichyl glucosyltransferase. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., **95**, pp 13200-13205.

Kranz C., Denecke J., Lehrman M.A., Ray S., Kienz P., Kreissel G., Sagi D., Peter-Katalinic J., Freeze H.H., Schmid T., Jackowski-Dohrmann S., Harms E. and Marquardt T., (2001) A mutation in the human MPDU1 gene causes congenital disorder of glycosylation type If (CDG-If).

J. Clin. Invest., 108, pp 1613-1619.

Kranz C., Ng B.G., Sun L., Sharma V., Eklund E.A., Miura Y., Ungar D., Lupashin V., Winkel R.D., Cipollo J.F., Costello C.E., Loh E., Hong W. and Freeze H.H., (2007a) COG8 deficiency causes new congenital disorder of glycosylation type IIh. Hum. Mol. Genet., **16**, pp 731-741.

Kranz C., Jungeblut C., Denecke J., Erlekotte A., Sohlbach C., Debus V., Kehl H.G., Harms E., Reith A., Reichel S., Grobe H., Hammersen G., Schwarzer U. and Marquardt T.,(2007b) A defect in dolichol phosphate biosynthesis causes a new inherited disorder with death in early infancy.

Am. J. Hum. Genet., 80, pp 433-440.

Kreil G., (1995) Hyaluronidases-a group of neglected enzymes. Protein Sci., **4**, pp 1666-1669.

L

Li H.H., Yu W.H., Rozengurt N., Zhao H.Z., Lyons K.M., Anagnostaras S., Fanselow M.S., Suzuki K., Vanier M.T. and Neufeld E.F., (1999) Mouse model of Sanfilippo syndrome type B produced by targeted disruption of the gene encoding alpha-N-acetylglucosaminidase. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., **96**, pp 14505-14510.

Li D., Mallory T. and Satomura S., (2001) AFP-L3: a new generation of tumor marker for hepatocellular carcinoma. Clin. Chim. Acta., **313**, pp 15-19.

Liour S.S., Jones M.Z., Suzuki M., Bieberich E. and Yu R.K., (2001) Metabolic studies of glycosphingolipid accumulation in mucopolysaccharidosis IIID. Mol. Genet Metab., **72**, pp 239-247.

Livingston B.D., Crimi C., Grey H., Ishioka G., Chisari F.V., Fikes J., Grey H., Chesnut R.W. and Sette A., (1997) The hepatitis B virus-specific CTL responses induced in humans by lipopeptide vaccination are comparable to those elicited by acute viral infection. J. Immunol., **159**, pp 1383-1392.

Loir M. and Lanneau M., (1984) Structural function of the basic nuclear proteins in ram spermatids. J. Ultrastruct. Res., **86**, pp 262-272.

Loir M., Bouvier D., Fornells M., Lanneau M. and Subirana J.A., (1985) Interactions of nuclear proteins with DNA, during sperm differentiation in the ram. Chromosoma, **92**, pp 304-312.

Lübke T., Marquardt T., von Figura K. and Körner C., (1999) A new type of carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome due to a decreased import of GDP-fucose into the golgi. J. Biol. Chem., **274**, pp 25986-25989. Lücke T., Höppner W., Schmidt E., Illsinger S. and Das A.M., (2004) Fabry disease: reduced activities of respiratory chain enzymes with decreased levels of energy-rich phosphates in fibroblasts. Mol. Genet. Metab., **82**, pp 93-97.

Luerssen H., Maier W.M., Hoyer-Fender S. and Engel W., (1989) The nucleotide sequence of rat transition protein 2 (TP2) cDNA. Nucleic Acids Res., **17**, pp 3585.

Luzio J.P., Rous B.A., Bright N.A., Pryor P.R., Mullock B.M. and Piper R.C., (2000) Lysosome-endosome fusion and lysosome biogenesis. J. Cell. Sci., **113**, pp 1515-1524.

Μ

Martinez-Duncker I., Dupré T., Piller V., Piller F., Candelier J.J., Trichet C., Tchernia G., Oriol R. and Mollicone R., (2005) Genetic complementation reveals a novel human congenital disorder of glycosylation of type II, due to inactivation of the Golgi CMP-sialic acid transporter. Blood, **105**, pp 2671-2676.

Mechref Y. and Novotny M.V., (2002) Structural investigations of glycoconjugates at high sensitivity. Chem. Rev., **102**, pp 321-369.

Meistrich M.L., Mohapatra B., Shirley C.R. and Zhao M., (2003) Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. Chromosoma, **111**, pp 483-488.

Mellman I., Fuchs R. and Helenius A., (1986) Acidification of the endocytic and exocytic pathways. Annu. Rev. Biochem., **55**, pp 663-700.

Michalski J.C. and Klein A., (1999) Glycoprotein lysosomal storage disorders: alpha- and beta-mannosidosis, fucosidosis and alpha-N-acetylgalactosaminidase deficiency. Biochim. Biophys. Acta., **1455**, pp 69-84.

Molinari M., Calanca V., Galli C., Lucca P. and Paganetti P., (2003) Role of EDEM in the release of misfolded glycoproteins from the calnexin cycle. Science., 299, pp 1397-1400.

Morelle W., Michalski J.C., (2005) Glycomics and mass spectrometry. Curr. Pharm. Des., **11**, pp 2615-2645.

Morelle W., Flahaut C., Michalski J.C., Louvet A., Mathurin P. and Klein A., (2006a) Mass spectrometric approach for screening modifications of total serum N-glycome in human diseases: application to cirrhosis. Glycobiology., **16**, pp 281-293. Morelle W., Canis K., Chirat F., Faid V. and Michalski J.C., (2006b) The use of mass spectrometry for the proteomic analysis of glycosylation. Proteomics., **6**, pp 3993-4015.

Morelle W. and Michalski J.C., (2007) Analysis of protein glycosylation by mass spectrometry. Nat. Protoc., **2**, pp 1585-1602.

Mortara L., Letourneur F., Villefroy P., Beyer C., Gras-Masse H., Guillet J.G. and Bourgault-Villada I., (2000) Temporal loss of Nef-epitope CTL recognition following macaque lipopeptide immunization and SIV challenge. Virology, **278**, pp 551-561.

Ν

Naimy H., Leymarie N., Bowman M.J. and Zaia J., (2008) Characterization of heparin oligosaccharides binding specifically to antithrombin III using mass spectrometry. Biochemistry, **47**, pp 3155-3161.

Niehues R., Hasilik M., Alton G., Körner C., Schiebe-Sukumar M., Koch H.G., Zimmer K.P., Wu R., Harms E., Reiter K., von Figura K., Freeze H.H., Harms H.K. and Marquardt T., (1998)

Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type Ib. Phosphomannose isomerase deficiency and mannose therapy.

J. Clin. Invest., **101**, pp 1414-1420.

Nishikawa S.I., Fewell S.W., Kato Y., Brodsky J.L. and Endo T., (2001) Molecular chaperones in the yeast endoplasmic reticulum maintain the solubility of proteins for retrotranslocation and degradation. J. Cell. Biol., **153**, pp 1061-1070.

Noda K., Miyoshi E., Uozumi N., Yanagidani S., Ikeda Y., Gao C., Suzuki K., Yoshihara H., Yoshikawa K., Kawano K., Hayashi N., Hori M. and Taniguchi N., (1998) Gene expression of alpha1-6 fucosyltransferase in human hepatoma tissues: a possible implication for increased fucosylation of alpha-fetoprotein. Hepatology., **28**, pp 944-952.

0

Oda Y., Hosokawa N., Wada I. and Nagata K., (2003) EDEM as an acceptor of terminally misfolded glycoproteins released from calnexin. Science., 299, pp 1394-1397.

Owada M. and Neufeld E.F., (1982)

Is there a mechanism for introducing acid hydrolases into liver lysosomes that is independent of mannose 6-phosphate recognition? Evidence from I-cell disease. Biochem. Biophys. Res. Commun., **105**, pp 814-820. Opat A.S., van Vliet C. and Gleeson P.A., (2001) Trafficking and localisation of resident Golgi glycosylation enzymes. Biochimie., **83**, pp 763-773.

Р

Pan S., Wang Y., Quinn J.F., Peskind E.R., Waichunas D., Wimberger J.T., Jin J., Li J.G.,
Zhu D., Pan C. and Zhang J., (2006)
Identification of glycoproteins in human cerebrospinal fluid with a complementary proteomic approach.
J. Proteome Res., 5, pp 2769-2779.

Pancré V., Gras-Masse H., Delanoye A., Herno J., Capron A. and Auriault C., (1996) Induction of cytotoxic T-cell activity by the protective antigen of Schistosoma mansoni Sm28GST or its derived C-terminal lipopeptide Scand. J. Immunol., **44**, pp 485-492.

Paradis V., (2005) Glycomics: a new taste of cirrhosis marker. J. Hepatol., **43**, pp 913-914.

Parekh R.B., Dwek R.A., Sutton B.J., Fernandes D.L., Leung A., Stanworth D., Rademacher T.W., Mizuochi T., Taniguchi T., Matsuta K., Takeuchi F., Nagano Y. Miyamoto T. and Kobata A., (1985) Association of rheumatoid arthritis and primary osteoarthritis with changes in the glycosylation pattern of total serum IgG.

Nature, **316**, pp 452-457.

Paschke E., Milos I., Kreimer-Erlacher H., Hoefler G., Beck M., Hoeltzenbein M., Kleijer W., Levade T., Michelakakis H. and Radeva B., (2001)
Mutation analyses in 17 patients with deficiency in acid beta-galactosidase: three novel point mutations and high correlation of mutation W273L with Morquio disease type B.
Hum. Genet., **109**, pp 159-166.
Patil C. and Walter P., (2001)
Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals.
Curr. Opin. Cell. Biol., **13**, pp 349-355.

Peters C., Braun M., Weber B., Wendland M., Schmidt B., Pohlmann R., Waheed A. and von Figura K., (1990) Targeting of a lysosomal membrane protein: a tyrosine-containing endocytosis signal in the cytoplasmic tail of lysosomal acid phosphatase is necessary and sufficient for targeting to lysosomes.

EMBO J., 9, pp 3497-3506.

Pless D.D. and Lennarz W.J., (1974) Enzymatic conversion of proteins to glycoproteins. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., **74**, pp 134-138.

Q

Qiu R. and Regnier F.E., (2005a) Use of multidimensional lectin affinity chromatography in differential glycoproteomics. Anal. Chem., **77**, pp 2802-2809.

Qiu R. and Regnier F.E., (2005b) Comparative glycoproteomics of N-linked complex-type glycoforms containing sialic acid in human serum. Anal. Chem., **77**, pp 7225-7231.

R

Reczek D., Schwake M., Schröder J., Hughes H., Blanz J., Jin X., Brondyk W., Van Patten S., Edmunds T. and Saftig P., (2007) LIMP-2 is a receptor for lysosomal mannose-6-phosphate-independent targeting of betaglucocerebrosidase. Cell, **131**, pp 770-783.

Reitman M.L. and Kornfeld S., (1981) Lysosomal enzyme targeting. N-Acetylglucosaminylphosphotransferase selectively phosphorylates native lysosomal enzymes. J. Biol. Chem., **256**, pp 11977-11980.

Rudd P.M., Morgan B.P., Wormald M.R., Harvey D.J., van den Berg C.W., Davis S.J., Ferguson M.A. and Dwek R.A., (1997) The glycosylation of the complement regulatory protein, human erythrocyte CD59. J. Biol. Chem., **272**, pp 7229-7244.

Russell C., Hendson G., Jevon G., Matlock T., Yu J., Aklujkar M., Ng K.Y. and Clarke L.A., (1998) Murine MPS I: insights into the pathogenesis of Hurler syndrome. Clin. Genet., **53**, pp 349-361.

Russell J.W., Gill J.S., Sorenson E.J., Schultz D.A. and Windebank A.J., (2001) Suramin-induced neuropathy in an animal model. J. Neurol. Sci., **192**, pp 71-80.

S

Sautière P., Martinage A., Bélaiche D., Arkhis A. and Chevaillier P., (1988) Comparison of the amino acid sequences of human protamines HP2 and HP3 and of intermediate basic nuclear proteins HPS1 and HPS2. Structural evidence that HPS1 and HPS2 are pro-protamines.

J. Biol. Chem., 263, pp 11059-11062.

Sauzet J.P., Déprez B., Martinon F., Guillet J.G., Gras-Masse H. and Gomard E., (1995) Long-lasting anti-viral cytotoxic T lymphocytes induced in vivo with chimericmultirestricted lipopeptides. Vaccine, **13**, pp 1339-1345.

Schähs M., Strasser R., Stadlmann J., Kunert R., Rademacher T. and Steinkellner H., (2007) Production of a monoclonal antibody in plants with a humanized N-glycosylation pattern. Plant Biotechnol. J., **5**, pp 657-663.

Schenk B., Imbach T., Frank C.G., Grubenmann C.E., Raymond G.V., Hurvitz H., Korn-Lubetzki I., Revel-Vik S., Raas-Rotschild A., Luder A.S., Jaeken J., Berger E.G., Matthijs G., Hennet T. and Aebi M., (2001)

MPDU1 mutations underlie a novel human congenital disorder of glycosylation, designated type If.

J. Clin. Invest., 108, pp 1687-1695. Erratum in: J. Clin. Invest. 2003, 111(6):925.

Schild H., Norda M., Deres K., Falk K., Rötzschke O., Wiesmüller K.H., Jung G. and Rammensee H.G., (1991a)

Fine specificity of cytotoxic T lymphocytes primed in vivo either with virus or synthetic lipopeptide vaccine or primed in vitro with peptide.

J. Exp. Med., **174**, pp 1665-1668.

Schild H., Deres K., Wiesmüller K.H., Jung G. and Rammensee H.G., (1991b) Efficiency of peptides and lipopeptides for in vivo priming of virus-specific cytotoxic T cells.

Eur. J. Immunol., 21, pp 2649-2654.

Schmidt B., Selmer T., Ingendoh A. and von Figura K.,(1995) A novel amino acid modification in sulfatases that is defective in multiple sulfatase deficiency. Cell, **82**, pp 271-278.

Schoer J.K., Gallegos A.M., McIntosh A.L., Starodub O., Kier A.B., Billheimer J.T. and Schroeder F., (2000) Lysosomal membrane cholesterol dynamics. Biochemistry, **39**, pp 7662-7677.

Schröder B., Wrocklage C., Pan C., Jäger R., Kösters B., Schäfer H., Elsässer H.P., Mann M. and Hasilik A., (2007) Integral and associated lysosomal membrane proteins. Traffic, **8**, pp 1676-1686.

Schütt F., Bergmann M., Holz F.G. and Kopitz J., (2002) Isolation of intact lysosomes from human RPE cells and effects of A2-E on the integrity of the lysosomal and other cellular membranes. Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol., **240**, pp 983-988.

Scott H.S., Litjens T., Nelson P.V., Brooks D.A., Hopwood J.J., Morris C.P., (1992) alpha-L-iduronidase mutations (Q70X and P533R) associate with a severe Hurler phenotype. Hum. Mutat., **1**, pp 333-339.

Seth A., Yasutomi Y., Jacoby H., Callery J.C., Kaminsky S.M., Koff W.C., Nixon D.F. and Letvin N.L., (2000) Evaluation of a lipopeptide immunogen as a therapeutic in HIV type 1-seropositive individuals. AIDS Res. Hum. Retroviruses., 16, pp 337-343.

Sethuraman N. and Stadheim T.A., (2006) Challenges in therapeutic glycoprotein production. Curr. Opin. Biotechnol., **17**, pp 341-346.

Shang J., Körner C., Freeze H. and Lehrman M.A., (2002) Extension of lipid-linked oligosaccharides is a high-priority aspect of the unfolded protein response: endoplasmic reticulum stress in Type I congenital disorder of glycosylation fibroblasts. Glycobiology., **12**, pp 307-317.

Shirley C.R., Hayashi S., Mounsey S., Yanagimachi R, Meistrich M.L., (2004) Abnormalities and reduced reproductive potential of sperm from Tnp1- and Tnp2-null double mutant mice. Biol. Reprod., **71**, pp 1220-1229.

Siegel D.A. and Walkley S.U., (1994) Growth of ectopic dendrites on cortical pyramidal neurons in neuronal storage diseases correlates with abnormal accumulation of GM2 ganglioside. J. Neurochem., **62**, pp 1852-1862.

Simonaro C.M., Haskins M.E. and Schuchman E.H., (2001) Articular chondrocytes from animals with a dermatan sulfate storage disease undergo a high rate of apoptosis and release nitric oxide and inflammatory cytokines: a possible mechanism underlying degenerative joint disease in the mucopolysaccharidoses. Lab. Invest., **81**, pp 1319-1328.

Simons J.F., Ferro-Novick S., Rose M.D. and Helenius A.,(1995) BiP/Kar2p serves as a molecular chaperone during carboxypeptidase Y folding in yeast. J. Cell. Biol., **130**, pp 41-49.

Singh J. and Rao M.R., (1987) Interaction of rat testis protein, TP, with nucleic acids in vitro. Fluorescence quenching, UV absorption, and thermal denaturation studies. J. Biol. Chem., **262**, pp 734-740.

Snider M.D. and Rogers O.C., (1984) Transmembrane movement of oligosaccharide-lipids during glycoprotein synthesis. Cell, **36**, pp 753-761.

Spik G., Strecker G., Fournet B., Bouquelet S., Montreuil J., Dorland L., van Halbeek H. and Vliegenthart J.F., (1982) Primary structure of the glycans from human lactotransferrin. Eur. J. Biochem., **121**, pp 413-419 Spiro R.G., Zhu Q., Bhoyroo V. and Hans-Dieter Söling H., (1996) Definition of the Lectin-like Properties of the Molecular Chaperone, Calreticulin, and Demonstration of Its Copurification with Endomannosidase from Rat Liver Golgi J. Biol. Chem., **271**, pp 11588-11594.

Stinchcombe J.C., Majorovits E., Bossi G., Fuller S. and Griffiths G.M., (2006) Centrosome polarization delivers secretory granules to the immunological synapse. Nature, **443**, pp 462-465.

Sukegawa K., Nakamura H., Kato Z., Tomatsu S., Montaño A.M., Fukao T., Toietta G., Tortora P., Orii T. and Kondo N., (2000) Biochemical and structural analysis of missense mutations in N-acetylgalactosamine-6sulfate sulfatase causing mucopolysaccharidosis IVA phenotypes. Hum. Mol. Genet., **9**, pp 1283-1290.

Т

Thiel C., Schwarz M., Peng J., Grzmil M., Hasilik M., Braulke T., Kohlschütter A., von Figura K., Lehle L. and Körner C., (2003) A new type of congenital disorders of glycosylation (CDG-Ii) provides new insights into the early steps of dolichol-linked oligosaccharide biosynthesis. J. Biol. Chem., **278**, pp 22498-22505.

Tieu P.T., Bach G., Matynia A., Hwang M. and Neufeld E.F., (1995) Four novel mutations underlying mild or intermediate forms of alpha-L-iduronidase deficiency (MPS IS and MPS IH/S). Hum. Mutat., **6**, pp 55-59.

Tomatsu S., Fukuda S., Sukegawa K., Ikedo Y., Yamada S., Yamada Y., Sasaki T., Okamoto H., Kuwahara T., Yamaguchi S., Kiman T., Shintaku H., Isshiki G. and Orii T., (1991) Mucopolysaccharidosis type VII: characterization of mutations and molecular heterogeneity. Am. J. Hum. Genet., **48**, pp 89-96.

Triggs-Raine B., Salo T.J., Zhang H., Wicklow B.A. and Natowicz M.R., (1999) Mutations in HYAL1, a member of a tandemly distributed multigene family encoding disparate hyaluronidase activities, cause a newly described lysosomal disorder, mucopolysaccharidosis IX. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., **96**, pp 6296-6300.

Trombetta S.E., Bosch M., Parodi A.J., (1989) Glucosylation of glycoproteins by mammalian, plant, fungal, and trypanosomatid protozoa microsomal membranes. Biochemistry., **28**, pp 8108-8116.

Tsuda E., Goto M., Murakami A., Akai K., Ueda M., Kawanishi G., Takahashi N., Sasaki R., Chiba H., Ishihara H., Mori M., Tejima S., Endo S. and Arata Y., (1988) Comparative structural study of N-linked oligosaccharides of urinary and recombinant erythropoietins. Biochemistry., **27**, pp 5646-5654.

U

Ungar D., Oka T., Krieger M. and Hughson F.M., (2006) Retrograde transport on the COG railway. Trends Cell. Biol., **16**, pp 113-120.

V

van Berkel P.H., van Veen H.A., Geerts M.E., de Boer H.A. and Nuijens J.H., (1996) Heterogeneity in utilization of N-glycosylation sites Asn624 and Asn138 in human lactoferrin: a study with glycosylation-site mutants. Biochem. J., **319**, pp 117-122.

Van Patten S.M., Hughes H., Huff M.R., Piepenhagen P.A., Waire J., Qiu H., Ganesa C., Reczek D., Ward P.V., Kutzko J.P. and Edmunds T., (2007) Effect of mannose chain length on targeting of glucocerebrosidase for enzyme replacement therapy of Gaucher disease. Glycobiology., **17**, pp 467-478.

Van Schaftingen E. and Jaeken J., (1995) Phosphomannomutase deficiency is a cause of carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I. FEBS Lett., **377**, pp 318-320.

Van Weely S., Aerts J.M., Van Leeuwen M.B., Heikoop J.C., Donker-Koopman W.E., Barranger J.A., Tager J.M. and Schram A.W., (1990) Function of oligosaccharide modification in glucocerebrosidase, a membrane-associated lysosomal hydrolase. Eur. J. Biochem., **191**, pp 669-677.

Vanpouille C., Deligny A., Delehedde M., Denys A., Melchior A., Liénard X., Lyon M., Mazurier J., Fernig D.G. and Allain F., (2007) The heparin/heparan sulfate sequence that interacts with cyclophilin B contains a 3-Osulfated N-unsubstituted glucosamine residue. J. Biol. Chem., **282**, pp 24416-24429.

Varki A., (1993) Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. Glycobiology, **3**, pp 97-130.

Verbert A. and Cacan R., (1999) "Glyco-deglyco" processes during the biosynthesis of glycoproteins J. Soc. Biol., **193**, pp 101-110.

Vercoutter-Edouart A.S., Slomianny M.C., Dekeyzer-Beseme O., Haeuw J.F. and Michalski J.C., (2008) Glycoproteomics and glycomics investigation of membrane N-glycosylproteins from human colon carcinoma cells. Proteomics., **8**, pp 3236-3256. Verheul A.F., Udhayakumar V., Jue D.L., Wohlhueter R.M. and Lal A.A., (1995) Monopalmitic acid-peptide conjugates induce cytotoxic T cell responses against malarial epitopes: importance of spacer amino acids. J. Immunol. Methods., **182**, pp 219-226.

Villani G.R., Balzano N., Vitale D., Saviano M., Pavone V. and Di Natale P., (1999) Maroteaux-lamy syndrome: five novel mutations and their structural localization. Biochim. Biophys. Acta., **1453**, pp 185-192.

Vitiello A., Ishioka G., Grey H.M., Rose R., Farness P., LaFond R., Yuan L., Chisari F.V., Furze J., Bartholomeuz R. and Chesnut R.W., (1995) Development of a lipopeptide-based therapeutic vaccine to treat chronic HBV infection. I. Induction of a primary cytotoxic T lymphocyte response in humans. J. Clin. Invest., **95**, pp 341-349.

W

Wada Y., Azadi P., Costello C.E., Dell A., Dwek R.A., Geyer H., Geyer R., Kakehi K.,
Karlsson N.G., Kato K., Kawasaki N., Khoo K.H., Kim S., Kondo A., Lattova E., Mechref Y., Miyoshi E., Nakamura K., Narimatsu H., Novotny M.V., Packer N.H., Perreault H.,
Peter-Katalinic J., Pohlentz G., Reinhold V.N., Rudd P.M., Suzuki A., and Taniguchi N.,
(2007)
Comparison of the methods for profiling glycoprotein glycans--HUPO Human Disease
Glycomics/Proteome Initiative multi-institutional study.
Glycobiology, 17, pp 411-22.

Erratum in: Glycobiology, 2007, 17(5); p10G

Waheed A., Hasilik A. and von Figura K., (1981)

Processing of the phosphorylated recognition marker in lysosomal enzymes. Characterization and partial purification of a microsomal alpha-N-acetylglucosaminyl phosphodiesterase. J. Biol. Chem., **256**, pp 5717-5721.

Wang C.C. and Tsou C.L., (1998) Enzymes as chaperones and chaperones as enzymes. FEBS Lett., **425**, pp 382-384.

Ware F.E., Vassilakos A., Peterson P.A., Jackson M.R., Lehrman M.A. and Williams D.B., (1995)

The molecular chaperone calnexin binds Glc1Man9GlcNAc2 oligosaccharide as an initial step in recognizing unfolded glycoproteins.

J. Biol. Chem., **270**, pp 4697-4704.

Warren C.D. and Alroy J., (2000)Morphological, biochemical and molecular biology approaches for the diagnosis of lysosomal storage diseases.J. Vet. Diagn. Invest., 12, pp 483-496.

Weber B., Guo X.H., Kleijer W.J., van de Kamp J.J., Poorthuis B.J. and Hopwood J.J., (1999) Sanfilippo type B syndrome (mucopolysaccharidosis III B): allelic heterogeneity corresponds to the wide spectrum of clinical phenotypes. Eur. J. Hum. Genet., **7**, pp 34-44.

Wiertz E.J., Jones T.R., Sun L., Bogyo M., Geuze H.J. and Ploegh H.L., (1996a) The human cytomegalovirus US11 gene product dislocates MHC class I heavy chains from the endoplasmic reticulum to the cytosol. Cell, **84**, pp 769-779.

Wiertz E.J., Tortorella D., Bogyo M., Yu J., Mothes W., Jones T.R., Rapoport T.A. and Ploegh H.L., (1996b) Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction. Nature, **384**, pp 432-438.

Winchester B., Clayton P., Mian N., di-Tomaso E., Dell A., Reason A. and Keir G., (1995) The carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome: an experiment of nature in glycosylation. Biochem. Soc. Trans., **23**, pp 185-188.

Woodcock C.L., Frado L.L. and Rattner J.B., (1984) The higher-order structure of chromatin: evidence for a helical ribbon arrangement.J. Cell Biol., **99**, pp 42-52.

Wopereis S., Grünewald S., Morava E., Penzien J.M., Briones P., García-Silva M.T., Demacker P.N., Huijben K.M. and Wevers R.A., (2003) Apolipoprotein C-III isofocusing in the diagnosis of genetic defects in O-glycan biosynthesis. Clin. Chem., **49**, 1839-1845.

Wopereis S., Morava E., Grünewald S., Adamowicz M., Huijben K.M., Lefeber D.J. and Wevers R.A., (2005) Patients with unsolved congenital disorders of glycosylation type II can be subdivided in six distinct biochemical groups. Glycobiology, 15, pp 1312-1319.

Wopereis S., Lefeber D.J., Morava E. and Wevers R.A., (2006) Mechanisms in protein O-glycan biosynthesis and clinical and molecular aspects of protein O-glycan biosynthesis defects: a review. Clin. Chem., **52**, pp 574-600.

Wu X., Rush J.S., Karaoglu D., Krasnewich D., Lubinsky M.S., Waechter C.J., Gilmore R. and Freeze H.H., (2003) Deficiency of UDP-GlcNAc:Dolichol Phosphate N-Acetylglucosamine-1 Phosphate Transferase (DPAGT1) causes a novel congenital disorder of Glycosylation Type Ij. Hum. Mutat., **22**, pp 144-150. Wu X., Steet R.A., Bohorov O., Bakker J., Newell J., Krieger M., Spaapen L., Kornfeld S. and Freeze H.H., (2004) Mutation of the COG complex subunit gene COG7 causes a lethal congenital disorder. Nat. Med., **10**, pp 518-523.

Wu A.M., Lisowska E., Duk M. and Yang Z., (2008) Lectins as tools in glycoconjugate research. Glycoconj J. 2008.

Y

Yamashita K., Koide N., Endo T., Iwaki Y. and Kobata A., (1989) Altered glycosylation of serum transferrin of patients with hepatocellular carcinoma. J. Biol. Chem., **264**, pp 2415-2423.

Yamashita K., Ideo H., Ohkura T., Fukushima K., Yuasa I., Ohno K. and Takeshita K., (1993)

Sugar chains of serum transferrin from patients with carbohydrate deficient glycoprotein syndrome. Evidence of asparagine-N-linked oligosaccharide transfer deficiency. J. Biol. Chem., **268**, pp 5783-5789.

Yan Q. and Lennarz W.J., (1999) Oligosaccharyltransferase: a complex multisubunit enzyme of the endoplasmic reticulum. Biochem. Biophys. Res. Commun., **266**, pp 684-689.

Z

Zaia J., (2004) Mass spectrometry of oligosaccharides. Mass Spectrom. Rev., **23**, pp 161-227.

Zhang H., Li X.J., Martin D.B. and Aebersold R., (2003) Identification and quantification of N-linked glycoproteins using hydrazide chemistry, stable isotope labeling and mass spectrometry. Nat. Biotechnol., **21**, pp 660-666.

Zhao M., Shirley C.R., Mounsey S., Meistrich M.L., (2004) Nucleoprotein transitions during spermiogenesis in mice with transition nuclear protein Tnp1 and Tnp2 mutations. Biol. Reprod., **71**, pp 1016-1025.