

gen 20006907

50376  
1998  
219

N° d'ordre : 2387

Université des Sciences et Technologies de Lille

# Thèse

présentée par

**Didier COINTE**

pour obtenir le grade de

**Docteur de l'Université de Lille**

Spécialité : Biochimie



## **Etude de la glycosylation de l'érythropoïétine humaine recombinante produite dans des cellules lymphoblastoïdes humaines**

Soutenue le 7 décembre 1998 devant la commission d'examen

**Président :** Professeur André VERBERT

**Rapporteurs :** Professeur Rudolf GEYER  
Professeur Philippe ROUSSEL

**Examineurs :** Docteur Dominique BOUREL  
Professeur René CACAN  
Docteur Frédéric CHIRAT



*À la mémoire du Professeur Bernard Fournet*

*A Valérie*

*A mes parents*

Le travail présenté dans ce mémoire de thèse a été effectué dans le cadre d'une convention CIFRE (n° 395/93) entre le Laboratoire Français du Fractionnement et des Biotechnologies de Lille (LFB-Lille) et l'Université des Sciences et Technologies de Lille (USTL). Les différentes érythropoïétines humaines recombinantes ont été produites au LFB dans le laboratoire d'Ingénierie Cellulaire et Moléculaire (Département Recherche) dirigé par le Dr. D. Bourel et l'étude structurale des chaînes glycaniques a été réalisée à l'USTL dans le Laboratoire de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle (UMR n° 8576, CNRS) sous la responsabilité du Pr. A. Verbert et la co-direction scientifique du Dr. F. Chirat et du Dr. D. Bourel.

Je remercie très vivement Messieurs les Professeurs André Verbert, Rudolf Geyer, Philippe Roussel, René Cacan et Messieurs les Docteurs Dominique Bourel et Frédéric Chirat qui me font l'honneur de juger ce travail.

Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements au Docteur D. Bourel pour m'avoir confié l'étude structurale des chaînes glycaniques des trois érythropoïétines humaines recombinantes produites dans son laboratoire ainsi qu'à Monsieur le Professeur A. Verbert pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire.

Je tiens à remercier tout particulièrement :

Frédéric Chirat, pour son aide précieuse, ses conseils judicieux et ses encouragements.

Bernadette Coddeville et Yves Leroy du Laboratoire de Chimie Biologique ainsi que Roland Béliard et Arnaud Glacet du LFB de Lille, pour leur grande disponibilité et leur contribution à ce travail.

Je remercie vivement l'ensemble du personnel du Département Recherche du LFB de Lille et toutes les personnes, qui par leur participation à ce travail, nous ont permis de réaliser ce mémoire.

Ce travail a donné lieu à la publication et aux communications suivantes :

**Publication :**

**Determination of the sialylation level and of the ratio  $\alpha$ 2-3 /  $\alpha$ 2-6 sialyl linkages of N-glycans by methylation analyses.**

D. Cointe, Y. Leroy, F. Chirat (1998).

Carbohydrate Research, **311**, 51-59.

**Communications écrites :**

**Etude de la glycosylation d'une nouvelle molécule d'érythropoïétine humaine recombinante.**

D. Cointe, O. Kol, R. Béliard, D. Bourel et B. Fournet<sup>†</sup>.

XXI<sup>e</sup> Forum des Jeunes Chercheurs de la Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire, Reims, 5-8 juillet 1994.

**Glycosylation of a recombinant human erythropoietin produced by lymphoblastoid cell line.**

D. Cointe, O. Kol, R. Béliard, D. Bourel and B. Fournet<sup>†</sup>.

6<sup>th</sup> Joint Meeting of the Nederlandse Vereniging voor de Bestudering van Glycoconjugaten, the Studiengruppe Glykokonjugate der Gesellschaft für Biologische Chemie, and the Groupe Lillois de Glycobiologie, Lille, 19-20 septembre 1994.

**Study of sialylation pattern of glycoproteins : sialylation level and  $\alpha$  2-3/ $\alpha$  2-6 linkage ratio of sialic acids.**

D. Cointe, Y. Leroy, F. Chirat and B. Domon.

8<sup>th</sup> Joint Meeting of the Nederlandse Vereniging voor de Bestudering van Glycoconjugaten, the Groupe Lillois de Glycobiologie, and the Studiengruppe Glykokonjugate der Gesellschaft für Biologische Chemie, Giessen (Allemagne), 9-10 décembre 1996.

## ABBREVIATIONS

ATFA .....	Acide trifluoroacétique
BHK .....	Baby Hamster Kidney
CHO .....	Chinese Hamster Ovary
CMP .....	Cytidine monophosphate
CPG .....	Chromatographie en phase gazeuse
CE .....	Electrophorèse capillaire (Capillary Electrophoresis)
CZE .....	Capillary Zone Electrophoresis
DMB .....	1,2-Diamino-4,5méthylènedioxybenzène
ELISA .....	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
ES-MS .....	Spectrométrie de masse en mode électrospray (ElectroSpray-Mass Spectrometry)
Et .....	éthyl
FAB-MS .....	Fast Atom Bombardment-Mass Spectrometry
Fuc .....	L-Fucose
Gal .....	D-Galactose
GalNAc .....	N-acétylgalactosamine
GC-MS .....	Gas Chromatography-Mass Spectrometry
GDP .....	Guanosine diphosphate
GlcNAc .....	N-acétylglucosamine
HexNAc .....	N-acétylhexosamine
HPLC .....	Chromatographie Liquide Haute Performance (High Performance Liquid Chromatography)
LC-MS .....	Chromatographie liquide couplée à l'ES-MS (Liquid Chromatography- Mass Spectrometry)
LNT .....	LcOse <sub>4</sub>
LSTa .....	IV <sup>3</sup> NeuAcLcOse <sub>4</sub>
LSTc .....	IV <sup>6</sup> NeuAcnLcOse <sub>4</sub>
MALD-MS .....	Matrix Assisted Laser Desorption-Mass Spectrometry
Man .....	D-Mannose
Me .....	Méthyl
Neu5Ac .....	Acide N-acétylneuraminique
Neu5Gc .....	Acide N-glycolylneuraminique
P-P-Dol .....	Pyrophosphodolichol
PD-MS .....	Plasma Desorption-Mass Spectrometry
Pep .....	Peptide
RER .....	Réticulum Endoplasmique Rugueux
RMN .....	Résonance Magnétique Nucléaire
UDP .....	Uridine diphosphate
u.m.a. ....	unité de masse atomique

# TABLE DES MATIERES

## GENERALITES 1

<b>1. L'ÉRYTHROPOÏÉTINE HUMAINE.....</b>	<b>1</b>
1.1. SA DÉCOUVERTE.....	1
1.2. SYNTHÈSE DE L'ÉRYTHROPOÏÉTINE.....	2
1.2.1. <i>Les organes et les cellules</i> .....	2
1.2.2. <i>Le gène de l'érythropoïétine</i> .....	4
1.2.3. <i>La régulation de la synthèse de l'érythropoïétine</i> .....	4
1.3. LE RÉCEPTEUR DE L'ÉRYTHROPOÏÉTINE.....	6
1.4. RÔLE DE L'ÉRYTHROPOÏÉTINE DANS LA DIFFÉRENCIATION MYÉLOÏDE.....	7
<b>2. STRUCTURE DE L'ÉRYTHROPOÏÉTINE HUMAINE.....</b>	<b>9</b>
2.1. LA CHAÎNE PROTÉIQUE.....	9
2.2. LA GLYCOSYLATION ET SA BIOSYNTHÈSE.....	11
2.2.1. <i>Introduction</i> .....	11
2.2.2. <i>Les glycanes liés N-glycosidiquement</i> .....	12
2.2.2.1. Généralités.....	12
2.2.2.1.1. le noyau.....	12
2.2.2.1.2. les antennes.....	13
2.2.2.1.3. la périphérie.....	13
2.2.2.2. Biosynthèse des N-glycanes.....	14
2.2.2.2.1. Synthèse du N-glycane.....	15
2.2.2.2.2. Transfert sur la protéine.....	16
2.2.2.2.3. La maturation dans le R.E.R. et l'appareil de Golgi.....	16
2.2.2.3. Régulation de la biosynthèse.....	19
2.2.3. <i>Les glycanes liés O-glycosidiquement</i> .....	21
2.2.3.1. Structure des O-glycanes de type mucine.....	22
2.2.3.1.1. Les noyaux.....	22
2.2.3.1.2. Les squelettes.....	23
2.2.3.1.3. La périphérie.....	24
2.2.3.2. La biosynthèse des O-glycanes.....	25
2.2.3.3. La régulation.....	26
2.2.4. <i>La glycosylation de l'érythropoïétine humaine</i> .....	26
2.2.4.1. Structure des N-glycanes de l'érythropoïétine humaine urinaire.....	27
2.2.4.2. Structure des O-glycanes de l'érythropoïétine humaine urinaire.....	28
2.3. RÔLES BIOLOGIQUES DES GLYCANNES.....	29
2.3.1. <i>Rappel sur le rôle des glycanes</i> .....	29
2.3.1.1. Propriétés physico-chimiques.....	29



2.3.1.2. Modulation de l'activité biologique .....	30
2.3.1.3. Propriétés immunologiques .....	31
2.3.1.4. Rôle dans les phénomènes de reconnaissance .....	31
2.3.2. <i>Etude des relations structure-fonction de l'érythropoïétine humaine</i> .....	33
2.3.2.1. Rôle des glycanes dans la sécrétion de l'érythropoïétine .....	34
2.3.2.2. Rôles des glycanes dans l'activité biologique .....	35
2.3.2.3. Rôle des acides sialiques.....	36
<b>3. LES ÉRYTHROPOÏÉTINES HUMAINES RECOMBINANTES.....</b>	<b>37</b>
3.1. GÉNÉRALITÉS SUR LA PRODUCTION DE L'ÉRYTHROPOÏÉTINE HUMAINE RECOMBINANTE .....	37
3.2. LES DIFFÉRENTS SYSTÈMES D'EXPRESSION.....	39
3.2.1. <i>Production par des cellules CHO</i> .....	39
3.2.2. <i>Production par des cellules BHK</i> .....	41
3.2.3. <i>Production par des cellules HeLa</i> .....	42
3.2.4. <i>Production par des cellules Namalwa</i> .....	43
3.2.5. <i>Production par des cellules de tabac</i> .....	43
<b>4. PATHOLOGIES LIÉS À L'ÉRYTHROPOÏÉTINE ET À SON RÉCEPTEUR.....</b>	<b>44</b>
4.1. LES ANÉMIES.....	44
4.2. LES POLYGLOBULIES.....	45
4.3. LES ÉRYTHROLEUCÉMIES .....	46
<b>5. APPLICATIONS THÉRAPEUTIQUES.....</b>	<b>47</b>
5.1. INTÉRÊT THÉRAPEUTIQUE DE L'ÉRYTHROPOÏÉTINE HUMAINE RECOMBINANTE .....	47
5.1.1. <i>Anémie de l'insuffisance rénale</i> .....	47
5.1.2. <i>Anémie associée aux cancers</i> .....	50
5.1.3. <i>Prélèvement sanguin autologue différé</i> .....	51
5.1.4. <i>Autres indications</i> .....	51
5.2. AUTRES APPLICATIONS .....	52
<b>6. OBJECTIF DE NOTRE TRAVAIL.....</b>	<b>55</b>
<b>MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>57</b>
<b>1. MATÉRIEL .....</b>	<b>57</b>
<b>2. COMPOSITION MOLLAIRE EN MONOSACCHARIDES .....</b>	<b>58</b>
<b>3. ETUDE QUALITATIVE DES ACIDES SIALIQUES .....</b>	<b>58</b>
3.1. DÉSIALYLATION CHIMIQUE .....	58
3.2. DÉRIVATION ET ANALYSE DES ACIDES SIALIQUES LIBRES.....	59

<b>4. ETUDES DE LA GLYCOSYLATION DES TROIS ÉRYTHROPOÏÉTINES HUMAINES RECOMBINANTES.....</b>	<b>59</b>
4.1. RÉDUCTION ET ALKYLATION DES ÉRYTHROPOÏÉTINES.....	59
4.2. HYDROLYSE ENZYMATIQUE PAR L'ENDOPROTÉINASE GLU-C .....	60
4.3. SÉPARATION DES PEPTIDES ET GLYCOPEPTIDES.....	60
4.4. ELECTROPHORÈSE CAPILLAIRE .....	60
4.5. SÉQUENÇAGE PEPTIDIQUE .....	61
4.6. ANALYSE DES GLYCOPEPTIDES PAR ES-MS ET LC-MS.....	61
<b>RESULTATS.....</b>	<b>63</b>
<b>1. COMPOSITION EN MONOSACCHARIDES DES TROIS LOTS D'ÉRYTHROPOÏÉTINE.....</b>	<b>63</b>
1.1. MÉTHODE UTILISÉE .....	63
1.2. RÉSULTATS-DISCUSSION .....	64
<b>2. ETUDE DE LA SIALYLATION.....</b>	<b>66</b>
2.1. ANALYSE QUANTITATIVE .....	66
2.1.1. Détermination du taux de sialylation et du pourcentage de liaison $\alpha$ -(2→3)/ $\alpha$ -(2→6).....	66
2.1.2. Application aux 3 érythropoïétines 97P16, 97P19 et 97P22.....	84
2.1.2.1. Détermination du pourcentage de liaisons sialyles $\alpha$ -(2→3) et $\alpha$ -(2→6).....	84
2.1.2.2. Détermination du taux de sialylation .....	85
2.2. ANALYSE QUALITATIVE .....	87
2.2.1. Principe de la méthode .....	87
2.2.2. Résultats-discussion.....	90
<b>3. ETUDE DE LA STRUCTURE DES GLYCANNES DES 4 SITES DE GLYCOSYLATION DE CHACUNES DES ÉRYTHROPOÏÉTINES HUMAINES RECOMBINANTES .....</b>	<b>91</b>
3.1. PRINCIPE DE LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE ES-MS .....	92
3.2. ANALYSE HPLC ET CE DES 3 HYDROLYSATS .....	95
3.3. IDENTIFICATION DES DIFFÉRENTS GLYCOPEPTIDES.....	97
3.4. ANALYSE DES GLYCOPEPTIDES DES TROIS ÉRYTHROPOÏÉTINES HUMAINES RECOMBINANTES PAR ES-MS.....	98
3.4.1. Enoncé de la méthode de déduction des structures glycaniques .....	98
3.4.2. Etude du site Ser-126 des trois lots d'érythropoïétine .....	99
3.4.3. Etude des sites de N-glycosylation .....	101
3.4.3.1. Généralités .....	101
3.4.3.2. Analyse du site de glycosylation Asn-24 désialylé.....	103
3.4.3.2.1. Analyse du pic 4 du site de glycosylation Asn-24 de l'érythropoïétine humaine recombinante 97P19 .....	103
3.4.3.2.2. Analyse du pic 5 du site de glycosylation Asn-24 de l'érythropoïétine humaine recombinante 97P19 .....	106

3.4.3.2.3. Analyse du pic 6 du site de glycosylation Asn-24 de l'érythropoïétine humaine recombinante 97P19	108
3.4.3.2.4. Conclusion	110
3.4.3.2.5. Cas des érythropoïétines 97P16 et 97P22	110
3.4.3.2.6. Comparaison du site de glycosylation Asn-24 des 3 érythropoïétines humaines recombinantes	111
3.4.3.2.7. Conclusion générale	113
3.4.3.3. Analyse du site de glycosylation Asn-38 désialylé	114
3.4.3.3.1. Analyse du pic 15 du site de glycosylation Asn-38 de l'érythropoïétine humaine recombinante 97P19	115
3.4.3.3.2. Analyse du pic 16 du site de glycosylation Asn-38 de l'érythropoïétine humaine recombinante 97P19	116
3.4.3.3.3. Conclusion	117
3.4.3.3.4. Cas des érythropoïétines humaines recombinantes 97P16 et 97P22	118
3.4.3.3.5. Comparaison du site Asn-38 des 3 érythropoïétines humaines recombinantes	118
3.4.3.3.6. Conclusion générale	120
3.4.3.4. Analyse du site de glycosylation Asn-83 désialylé	121
3.4.3.4.1. Analyse du site Asn-83 de l'érythropoïétine humaine recombinante 97P19	121
3.4.3.4.2. Conclusion	123
3.4.3.4.3. Cas des érythropoïétines humaines recombinantes 97P16 et 97P22	123
3.4.3.4.4. Comparaison du site Asn-83 des 3 érythropoïétines humaines recombinantes	123
3.4.3.4.5. Conclusion générale	125
<b>3.5. VÉRIFICATION DES CARACTÉRISTIQUES STRUCTURALES DES 3 ÉRYTHROPOÏÉTINES HUMAINES RECOMBINANTES PAR MÉTHYLATION</b>	<b>127</b>
3.5.1. Vérification de la présence de <i>N</i> -acétylglucosamine intercalaire	127
3.5.2. Confirmation de l'hyperfucoosylation	128
3.5.2.1. Principe	128
3.5.2.2. Résultats	129
3.5.3. Détermination du taux d'antennarisation	131
3.5.3.1. Principe	131
3.5.3.2. Résultats	132
3.5.4. Détermination du pourcentage de répétitions <i>N</i> -acétyllactosaminiques	133
3.5.4.1. Principe	133
3.5.4.2. Résultats	134
<b>DISCUSSION</b>	<b>135</b>
<b>CONCLUSION GENERALE</b>	<b>142</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>144</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>180</b>

# **GENERALITES**

# 1. L'érythropoïétine humaine

## 1.1. Sa découverte

L'idée de l'existence d'un facteur humoral contrôlant l'érythropoïèse (production des globules rouges) est probablement née du concept défini par le célèbre physiologiste Claude Bernard et ses collaborateurs selon lequel la prolifération et l'activité métabolique des tissus sont sous le contrôle de glandes endocrines.

C'est dans les années 1850 que Paul Bert et Denis Jourdanet montrèrent, en observant des personnes vivant à haute altitude ou placées dans une chambre de décompression, que l'effet physiologique des gaz dépendait de leur pression partielle et que le mal des montagnes était dû à une hypoxie. Mais le premier à observer les effets de l'hypoxie sur l'érythropoïèse est l'histologiste français Viault, en 1890, qui constata chez des individus revenant d'une expédition de trois semaines dans les montagnes de Morococha (4400 m, Pérou) une augmentation de 5 à  $8 \cdot 10^6$  érythrocytes/ $\mu\text{L}$  de sang. En 1893, Friedrich Miescher décrivit les bienfaits d'un séjour en altitude, dans les hautes montagnes alpines, sur la stimulation de l'érythropoïèse chez des patients atteints d'anémie ou de tuberculose (Jelkmann, 1992).

L'hypothèse du contrôle de l'érythropoïèse par un facteur hormonal, d'abord appelé « hémopoïétine », fut émise pour la première fois par Carnot et Deflandre en 1906. Toutefois, faute d'arguments convaincants, il fallut attendre près de cinquante ans pour que soit accepté ce concept de l'existence d'une hormone hémopoïétique.

En 1948, Bonsdorff et Jalavisto introduirent pour la première fois le nom « érythropoïétine » réduisant ainsi l'action de ce facteur hormonal à la seule production des globules rouges.

En 1950, Reissmann et Ruhestroth-Bauer montrent que l'hyperplasie érythrocytaire et la réticulocytose apparaissent quand une hypoxémie ou une anémie est déclenchée chez un animal parabiotique. Ce n'est que trois années plus tard qu'Erslev démontre de façon formelle qu'un facteur érythropoïétique était présent dans le plasma de lapins souffrant d'hypoxie anémique. Des études ultérieures révélèrent que cette hormone était produite en réponse à un état hypoxique.

L'origine rénale de la biosynthèse de l'érythropoïétine remonte à 1957 grâce aux travaux de Jacobson *et al.* qui montrèrent, au cours d'une hypoxie provoquée, une absence d'activité de l'érythropoïétine dans le plasma d'animaux néphrectomisés. Cette observation corroborait la carence en érythropoïétine qu'ils avaient également observée chez des patients anémiques souffrant d'insuffisance rénale chronique. Un nouvel argument de l'origine rénale de l'érythropoïétine fut apporté par Kuratowska *et al.* (1961) ainsi que Fisher et Birdwell (1961) qui détectèrent une production d'érythropoïétine à partir de reins isolés et perfusés. La preuve formelle fut apportée par l'isolement de l'ARN messager de l'érythropoïétine dans des cellules rénales (Beru *et al.*, 1986 ; Schuster *et al.*, 1987).

Toutefois, le rein ne constitue pas le seul organe de production de l'érythropoïétine. En effet, les travaux de Katz *et al.* en 1968, montrèrent que le foie était capable de produire l'hormone. Plus tard, d'autres travaux (Fried, 1972; Erslev, 1990) confirmèrent cette origine hépatique.

## **1.2. Synthèse de l'érythropoïétine**

### **1.2.1. Les organes et les cellules**

Chez l'homme, le rein et le foie sont les deux seuls organes de production de l'érythropoïétine. Chez le fœtus, le foie constitue son principal lieu de production alors que chez l'adulte le rein est responsable de 85 % de sa production. Le transfert de la production

d'érythropoïétine du foie vers le rein serait le résultat d'une modification, durant le développement foetal, ou la conséquence d'un changement de l'oxygénation tissulaire (Barthomeuf *et al.*, 1996a).

Si la production d'érythropoïétine par le rein est admise depuis longtemps, la nature des cellules responsables de la synthèse de l'hormone reste l'objet de nombreuses controverses. En effet, de nombreux travaux (Krantz, 1991 ; Maxwell *et al.*, 1997) montrent que les cellules impliquées dans la production de l'érythropoïétine sont les cellules interstitielles péritubulaires présentes au niveau du cortex et de la zone médullaire externe du rein à proximité de l'appareil juxtaglomérulaire (Rocheman, 1987 ; Casadevall, 1995).

Toutefois, une production par les cellules tubulaires proximales du rein a également été mise en évidence (Shanks *et al.*, 1996).

Au niveau hépatique, deux populations cellulaires distinctes semblent sécréter l'hormone : les premières, majoritaires, sont des hépatocytes distribués autour des veines centro-lobulaires du foie (Krantz, 1991 ; Maxwell *et al.*, 1997) ; les secondes correspondent aux cellules fibroblastiques de Ito (Casadevall, 1995 ; Barthomeuf *et al.*, 1996a).

En dehors de la synthèse rénale et hépatique, de l'ARN messager de l'érythropoïétine été détecté au niveau des poumons, des ovaires, des testicules, de la rate et du cerveau (Varet, 1995 ; Maxwell *et al.*, 1997). Toutefois les quantités produites sont négligeables par rapport à celles produites par le rein et le foie.

Récemment, les travaux de Marti *et al.* (1997), effectués dans le système nerveux central, ont montré la présence de récepteurs de l'érythropoïétine au niveau de cellules neuronales ce qui est surprenant lorsque l'on sait que l'érythropoïétine ne traverse pas la barrière hématoencéphalique. Ces auteurs pensent que des cellules du cerveau (certains astrocytes) (Marti *et al.*, 1996) produiraient de l'érythropoïétine qui agirait de façon

paracrine pour induire le passage de la phase G<sub>0</sub> à la phase G<sub>1</sub> dans les cellules endothéliales du cerveau (Jelkmann, 1994 ; Yamaji *et al.*, 1996).

De même, des auteurs (Rich *et al.*, 1982 ; Rich, 1986) ont montré que des macrophages en culture produisaient de l'érythropoïétine. Ils pensent que cette production paracrine d'érythropoïétine par les macrophages permettrait de maintenir le taux basal d'érythropoïétine dans le sang alors que la production endocrine de l'hormone par les reins et le foie interviendrait pendant les états de stress hypoxique. Bien qu'attrayante, cette hypothèse manque de preuves expérimentales.

### **1.2.2. Le gène de l'érythropoïétine**

Le gène humain de l'érythropoïétine, localisé sur le bras long q21 du chromosome 7, est unique. L'érythropoïétine est codée par un gène formé de 5 exons, séparés par 4 introns (Boffa, 1991). Les exons II, III, IV sont codants ainsi qu'une partie de l'exon I et de l'exon V. En amont du codon d'initiation de la traduction ATG, on ne retrouve aucune des séquences promotrices habituelles telles que TATA box, CCAAT box. La région 5' non traduite comporte au moins 218 nucléotides, ce qui est inhabituel et pourrait correspondre à des régions régulatrices particulières (Varet *et al.*, 1988).

Les gènes simien et murin, également clonés, montrent un taux d'homologie avec le gène humain de 94% et 81% respectivement (Varet *et al.*, 1988 ; Jelkmann, 1992).

### **1.2.3. La régulation de la synthèse de l'érythropoïétine**

La synthèse d'érythropoïétine est induite principalement par l'hypoxie tissulaire, mais aussi par certains ions comme le cobalt, le nickel et le manganèse (Goldberg *et al.*, 1988 ; Göpfert *et al.*, 1996). L'induction par l'hypoxie est intense et rapide (2 heures). Elle entraîne la multiplication de cellules productrices et est suivie par la sécrétion

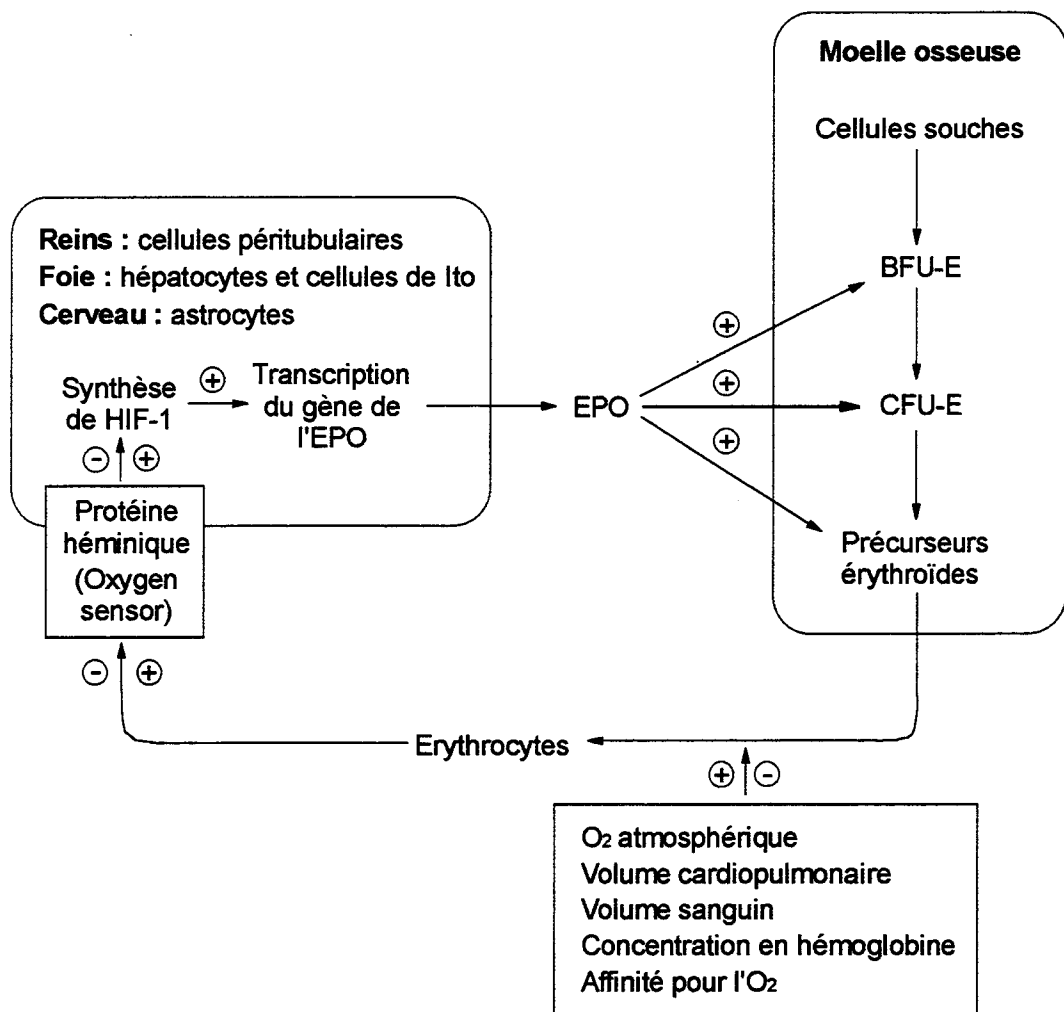


d'érythropoïétine nouvellement synthétisée car il n'existe pas de réserve intracellulaire d'érythropoïétine (Lacombe et Mayeux, 1995 ; Barthomeuf *et al.*, 1996a).

Les mécanismes de régulation par l'hypoxie sont encore incomplètement élucidés. Il existe au niveau des cellules productrices d'érythropoïétine, ou dans leur environnement immédiat, un système permettant de déceler les variations d'oxygène (oxygen sensor) (Koury et Bondurant, 1992 ; Lacombe et Mayeux, 1995). Cette régulation mettrait en jeu une protéine renfermant un groupement prosthétique héminique (Goldberg *et al.*, 1988 ; Göpfert *et al.*, 1996). Lorsque la concentration tissulaire en oxygène est élevée, cette protéine héminique adopterait une conformation « oxy », inactive. La diminution de la concentration d'oxygène la ferait passer à une conformation « désoxy » active. Cette hypothèse très séduisante n'a pas été confirmée car aucune protéine transactivatrice du gène de l'érythropoïétine n'a encore été isolée ou clonée.

Trois régions contrôlant l'expression tissulaire ont été mises en évidence en 5' du gène de l'érythropoïétine : une région de 6 Kb NRE (Negative Regulatory Element) qui réprime l'expression ubiquitaire non spécifique du gène de l'érythropoïétine dans les autres tissus, un élément de 8 Kb KIE (Kidney Inducibility Element) permettant l'expression rénale du gène et une région de 0,4 Kb LIE (Liver Inducibility Element) permettant son expression hépatique (Semenza *et al.*, 1991 ; Fandrey, 1995). Ces sites pourraient rendre compte de l'action des hormones thyroïdiennes sur la production d'érythropoïétine en réponse à l'hypoxie.

A l'extrémité 3' du gène, immédiatement après le site de polyadénylation, a été localisée une séquence de régulation sur laquelle se fixe spécifiquement un facteur inductible par l'hypoxie : HIF-1 (Hypoxia-Induced Factor) (Semenza *et al.*, 1992 ; Göpfert *et al.*, 1996). Cette protéine HIF-1, inductible par l'hypoxie, est présente dans les cellules productrices d'érythropoïétine mais aussi dans toutes les cellules de mammifères. Elle



**Figure 1 :** Régulation de l'érythropoïèse en fonction du taux d'oxygène (d'après Naffakh et Danos, 1996).

pourrait ainsi transactiver d'autres gènes cellulaires également activés par l'hypoxie comme dans le cas de la phosphoglycérate kinase 1 et la lactate déshydrogénase A.

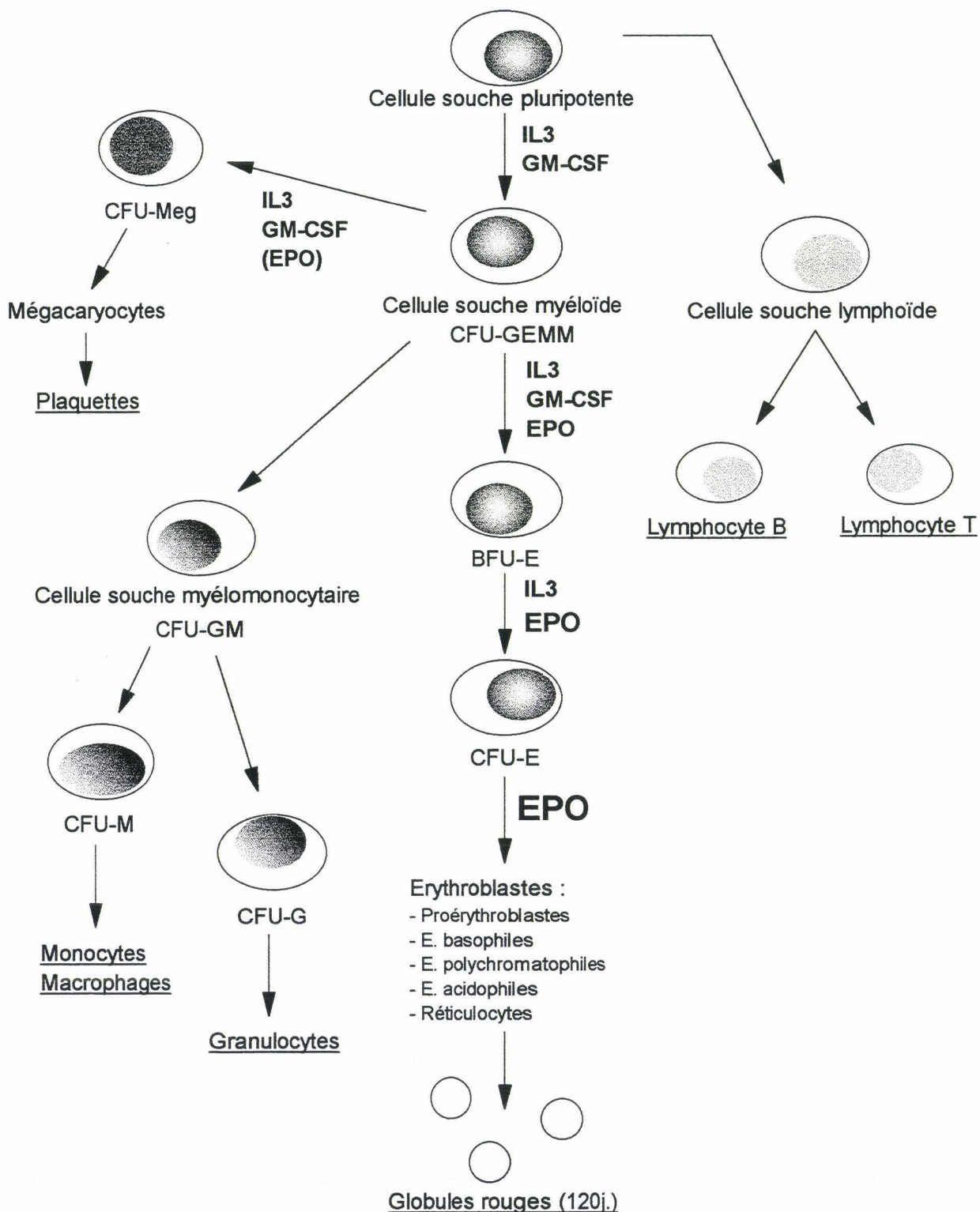
Une chute de l'hématocrite en dessous du seuil de 35 %, lors d'hémorragie par exemple, entraîne une augmentation du taux plasmatique d'érythropoïétine. Il en est de même lors du manque d'oxygène en altitude ou au cours de maladies cardiopulmonaires. A l'inverse, une élévation de la masse érythrocytaire, comme dans la polyglobulie réactionnelle à l'hypoxie, s'accompagne d'une réduction de la production d'érythropoïétine (feed-back négatif) (Fig. 1) (Boffa, 1991 ; Jelkmann, 1994).

### **1.3. Le récepteur de l'érythropoïétine**

Les cellules souches érythroïdes (Fig. 2 page 7), depuis les BFU-E (Burst Forming Unit-Erythroïd cells) jusqu'aux proérythroblastes, constituent les cibles principales de l'érythropoïétine en possédant à leur surface des récepteurs spécifiques (Koury et Bondurant, 1992 ; Youssoufian *et al.*, 1993).

Des récepteurs de l'érythropoïétine ont également été décrits à la surface des mégacaryocytes (Youssoufian *et al.*, 1993 ; Varet, 1995), des cellules endothéliales des veines ombilicales humaines (Youssoufian *et al.*, 1993 ; Varet, 1995) et au niveau du placenta de rat et de souris où ils pourraient jouer un rôle dans le transport de l'érythropoïétine au fœtus. De même, il a été rapporté que des cellules endothéliales du cerveau en possédaient (Digicaylioglu *et al.*, 1995 ; Yamaji *et al.*, 1996).

Chez l'homme, le récepteur de l'érythropoïétine est codé par un gène simple copie situé dans la région p du chromosome 19 (Jelkmann, 1992 ; Youssoufian *et al.*, 1993) organisé en 8 exons séparés par 7 introns sur approximativement 6 Kb d'ADN (Maouche *et al.*, 1991 ; Noguchi *et al.*, 1991). Il renferme 508 acides aminés (MM 330 KDa) et présente un haut degré d'homologie (82 %) avec le récepteur murin (Jelkmann, 1992). Ce récepteur



**Figure 2** : Les filiations dans le système érythropoïétique.

BFU : Burst Forming Unit ; CFU : Colony Forming Unit ; EPO : érythropoïétine ; GM-CSF : Granulocytes-Macrophages Colony Stimulating Factor ; IL : Interleukines ; E : Erythroïde ; Meg : Mégacaryocytes ; M : Monocytes ; G : Granulocytes.

est en fait un complexe multimérique composé de 3 monomères dont l'un de nature glycoprotéinique de 65 KDa permet la fixation de l'érythropoïétine (Todokoro *et al.*, 1987 ; Koury et Bondurant, 1992). Enfin, ce récepteur appartient à la famille des récepteurs de cytokines qui ont en commun de posséder un seul domaine transmembranaire, 2 ponts disulfure et le motif Trp-Ser-X-Trp-Ser dans leur domaine extracellulaire.

On distingue deux catégories de récepteur de l'érythropoïétine : l'un de très haute affinité pour l'érythropoïétine ( $K_d=0,09$  nM) et l'autre majoritaire (80 %) de faible affinité ( $K_d=0,57$  nM) (Sawyer *et al.*, 1987 ; Boffa, 1991). Le nombre de récepteurs à la surface des cellules cibles varie de 1000 (dans la plupart des cas) à 10000 au maximum (Mayeux *et al.*, 1987 ; Youssoufian *et al.*, 1993).

Les mécanismes moléculaires induits par la fixation de l'érythropoïétine sur son récepteur ne sont pas totalement élucidés. Toutefois, sa fixation provoque la phosphorylation de nombreuses protéines dont certains facteurs transcriptionnels (Dusanter-Fourt *et al.*, 1992 ; Gobert *et al.*, 1995 ; Damen et Krystal, 1996). De plus, la fixation de l'érythropoïétine sur son récepteur induit une augmentation dose-dépendante de calcium intracellulaire dans les cellules cibles en régulant les canaux ioniques perméables au calcium. Enfin, le taux d'AMPC intracellulaire augmenterait dans les cellules activées, bien que cela n'ait pas été démontré par tous les auteurs (Barthomeuf *et al.*, 1996a ; Kirito *et al.*, 1997).

#### **1.4. Rôle de l'érythropoïétine dans la différenciation myéloïde**

Chez l'homme, l'hématopoïèse comprend trois stades successifs (Metcalf, 1993) :

- i) la formation *de novo* de populations cellulaires hématopoïétiques dans le sac vitellin,
- ii) la formation *de novo* dans le fœtus des cellules hématopoïétiques définitives qui persisteront toute la vie adulte,

**Tableau 1 :** Composition en acides aminés de l'érythropoïétine humaine.

<b>acide aminé</b>	<b>quantité</b>
glycine	9
alanine	19
valine	11
leucine	23
isoleucine	5
sérine	10
thréonine	11
cystéine	4
méthionine	1
acide aspartique	6
asparagine	6
acide glutamique	12
glutamine	7
lysine	8
arginine	13
histidine	2
phénylalanine	4
tyrosine	4
tryptophane	3
proline	8

iii) la production continue dans le sang de cellules mûres à partir des cellules souches hématopoïétiques.

Comme nous l'avons déjà mentionné, l'érythropoïétine intervient, avec d'autres facteurs, au niveau de l'érythropoïèse pour activer la maturation des cellules souches en globules rouges (Liboi *et al.*, 1993) afin de compenser leur destruction journalière permanente. Dans certaines situations physiologiques ou pathologiques, la production de globules rouges peut être multipliée par 7 ou 8 (Barthomeuf *et al.*, 1996a).

Les cellules cibles de l'érythropoïétine sont présentes dans les organes hématopoïétiques représentés par la moëlle osseuse, la rate et le foie foetal (Koury et Bondurant, 1992). L'érythropoïétine n'intervient pas à tous les stades de la différenciation des cellules érythroïdes qui passe par un *continuum* de stades allant de la cellule souche hématopoïétique pluripotente à l'érythrocyte mature (Fig. 2, page 7). Ainsi, les principales cellules stimulées sont, par ordre de sensibilité croissante, les cellules CFU-GEMM (Colony Forming Unit-Granulocyte Erythroid Macrophage Megakaryocyte), les cellules BFU-E (Burst Forming Unit-Erythroid) et les cellules CFU-E (Colony Forming Unit-Erythroid) (Goldwasser, 1984).

Les cellules BFU-E, précurseurs érythroïdes très primitifs, sont définies comme étant des cellules à partir desquelles sont obtenus, après une période de développement de 14 à 21 jours, des érythroblastes contenant de l'hémoglobine. Quant aux cellules CFU-E, elles sont définies comme étant des cellules qui se différencient en érythroblastes hémoglobinisés après seulement 7 jours de culture (Krantz, 1991). Les cellules CFU-E sont les précurseurs des proérythroblastes dont la sensibilité à l'érythropoïétine commence à diminuer.

L'érythropoïétine agit sur la prolifération, la différenciation et la survie des cellules engagées dans la lignée érythrocytaire (Rocheman, 1987 ; Jelkmann, 1994). De plus, l'érythropoïétine active la division mitotique des proérythroblastes, des érythroblastes

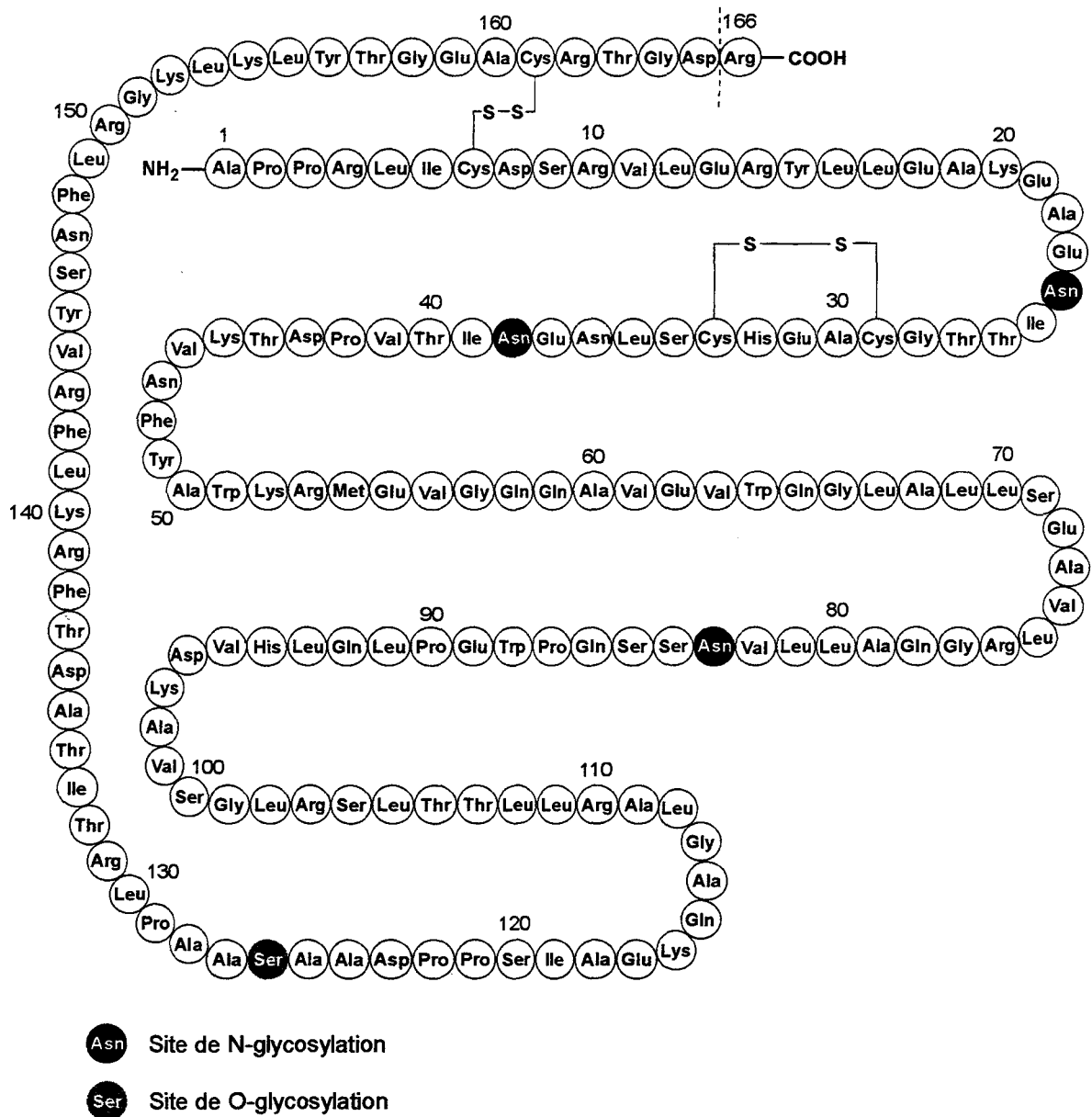


Figure 3 : Structure primaire de l'érythropoïétine humaine (Jelkman, 1992).



basophiles et accélère la libération dans le sang des réticulocytes nouvellement formés (Varet *et al.*, 1988 ; Jelkmann, 1992). Elle favorise aussi la synthèse d'hémoglobine en activant deux enzymes : l'acide  $\delta$ -aminolévulinique synthétase et la porphobilinogène désaminase (Rocheman, 1987 ; Barthomeuf *et al.*, 1996a). En synergie avec d'autres cytokines, l'érythropoïétine joue un rôle modulateur dans le contrôle du développement mégacaryocytaire et granulocytaire-monocytaire (Jelkmann, 1992).

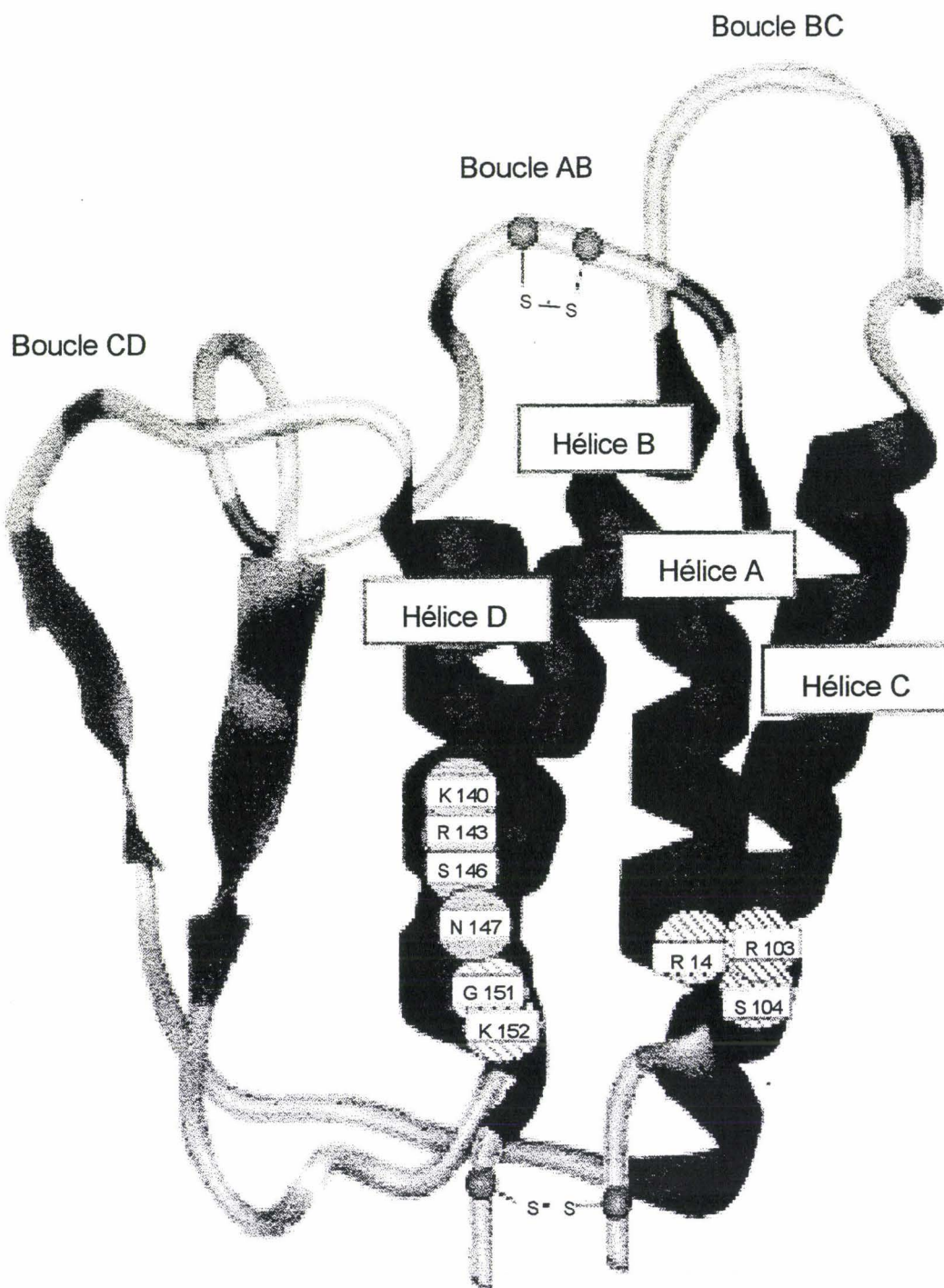
En conclusion, les progéniteurs cellulaires érythroïdes prolifèrent et se différencient jusqu'au stade réticulocyte en réponse à l'érythropoïétine. En son absence, ces événements n'ont pas lieu. Le mécanisme par lequel l'érythropoïétine intervient dans la différenciation progressive des cellules hématopoïétiques reste mystérieux.

## 2. Structure de l'érythropoïétine humaine

### 2.1. La chaîne protéique

L'érythropoïétine est synthétisée sous la forme d'une protéine de 193 acides aminés dont les 27 premiers forment un peptide signal qui n'est pas retrouvé dans la molécule circulante (MW 18 KDa) (Jelkmann, 1992). La composition en acides aminés de la protéine (tableau 1, page 8) montre qu'environ 40% des acides aminés sont hydrophobes (Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Trp, Tyr), que le taux d'acides aminés basiques (23; Arg, Lys et His) est légèrement plus élevé que celui des acides aminés acides (18; Asp et Glu). L'examen de la structure primaire de la protéine (Fig. 3) montre que les acides aminés cités ci-dessus sont distribués de façon relativement homogène tout le long du squelette protéique (Lai *et al.*, 1986). De plus, on note que 3 résidus d'asparagine (Asn24, 38 et 83) sont présents dans une séquence sequon Asn-X-Ser/Thr.

L'acide aminé constituant l'extrémité C-terminale de la protéine fait l'objet d'une controverse car certains auteurs (Recny *et al.*, 1987 ; Mayeux et Casadevall, 1990 ; Imai *et*



**Figure 4 :** Modèle de structure tridimensionnelle de l'érythropoïétine humaine. Les domaines fonctionnels importants pour l'interaction avec le récepteur sont représentés par les zones hachurées (D'après Wen *et al.*, 1994).

*al.*, 1990a ; Jelkmann, 1992) affirment qu'il s'agit de l'acide aspartique alors que pour Lai *et al.* (1986) il s'agit de l'arginine. Recny *et al.* (1987) ont émis l'hypothèse que l'érythropoïétine serait sécrétée sous une forme inactive possédant une arginine en position C-terminale et que son activation serait obtenue grâce à l'action d'une carboxypeptidase.

Concernant sa structure secondaire et tertiaire, l'érythropoïétine possède deux ponts disulfure qui s'établissent d'une part entre les cystéines en position 7 et 161 et d'autre part entre les cystéines en position 29 et 33 (Boissel *et al.*, 1993). Il semble que le pont disulfure entre les cystéines 29 et 33 ne soit pas indispensable au maintien de la stabilité de la protéine à l'inverse de celui entre les cystéines 7 et 161 (Boissel *et al.*, 1993; Elliott *et al.*, 1996).

Les méthodes de prédiction de structures secondaires ainsi que des données de dichroïsme circulaire révèlent, comme pour les autres cytokines décrites, l'existence de 4 hélices  $\alpha$  entre les résidus 9 et 22 (hélice A), 59 et 76 (hélice B), 90 et 107 (hélice C), 132 et 152 (hélice D) (Boissel *et al.*, 1993 ; Wen *et al.*, 1994).

L'érythropoïétine n'ayant pu être cristallisée à ce jour, aucune donnée cristallographique qui permettrait d'établir précisément sa structure spatiale n'est disponible. Toutefois, une structure tridimensionnelle établie à partir de nombreux paramètres (séquence en acides aminés, données de dichroïsme circulaire, ...) est présentée dans la figure 4. Ce modèle fait apparaître les quatre hélices  $\alpha$  (antiparallèles) qui sont reliées entre elles par des boucles peptidiques. Deux régions semblent jouer un rôle crucial dans l'activité biologique de l'érythropoïétine. La première région comprend l'arginine 14 de l'hélice A, l'arginine 103 et la sérine 104 de l'hélice C alors que la seconde région, comprend les résidus de glycine 151 et de lysine 152 de l'hélice D et vraisemblablement les résidus d'arginine 143, de sérine 146 et d'asparagine 147 (Wen *et al.*, 1994 ; Elliott *et al.*, 1997). Toute mutation dans l'une de ces deux régions entraîne une perte d'activité de l'érythropoïétine. Il en est de même lorsqu'un anticorps se fixe sur l'une d'elles.

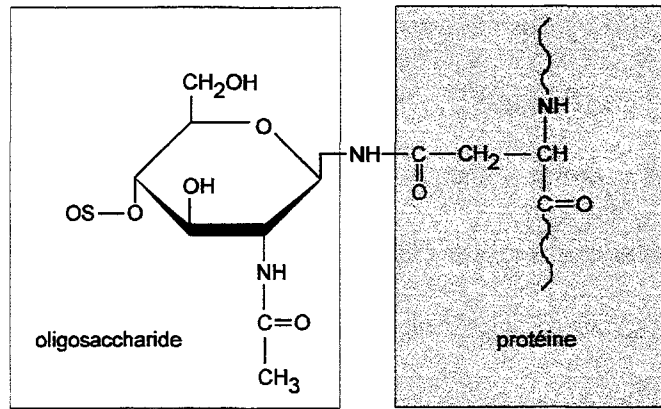


Figure 5a : Liaison de type *N*-glycosylprotéique.

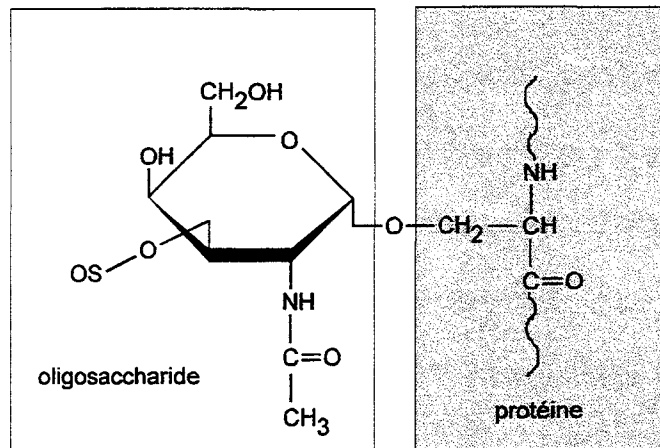


Figure 5b : Liaison de type *O*-glycosylprotéique entre un résidu de *N*-acétyl galactosamine et un résidu de sérine.

Tableau 2 : Types de liaison monosaccharides-acides aminés dans les *O*-glycosylprotéines

Type de glycoprotéine	Acide aminé	Monosaccharide
Type mucine	Ser/Thr	GalNAc
Type protéoglycane	Ser	Xyl
Type collagène	OH-Lys	Glc
Type glycogène	Ser/Thr	Glc
Type levure	Ser/Thr	Man
Type extensine	OH-Pro	fAra

## 2.2. La glycosylation et sa biosynthèse

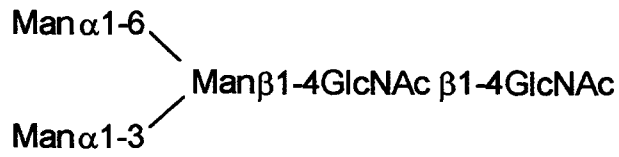
Après une brève définition des glycoprotéines, nous présenterons successivement :

- i) les *N*- et *O*-glycannes d'un point de vue général (définition, structures, biosynthèse),
- ii) les différentes structures glycaniques décrites dans l'érythropoïétine humaine urinaire (érythropoïétine naturelle),
- iii) les fonctions biologiques jouées *in vivo* et *in vitro* par ces glycannes,
- iv) les différentes érythropoïétines humaines recombinantes produites à ce jour,
- v) les intérêts à produire de l'érythropoïétine humaine recombinante.

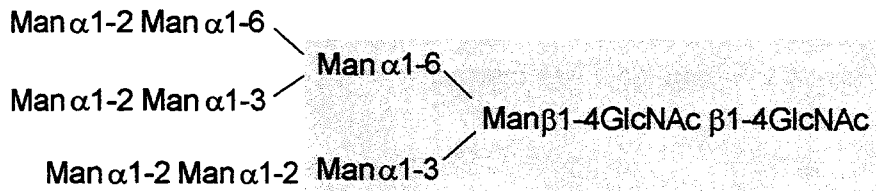
### 2.2.1. Introduction

Les glycoprotéines forment avec les glycolipides la famille des glycoconjugués. Elles résultent de l'association covalente entre une protéine et une ou plusieurs chaîne(s) oligosaccharidique(s). La nature de la liaison entre la protéine et la chaîne oligosaccharidique permet de définir deux grands types de glycoprotéines :

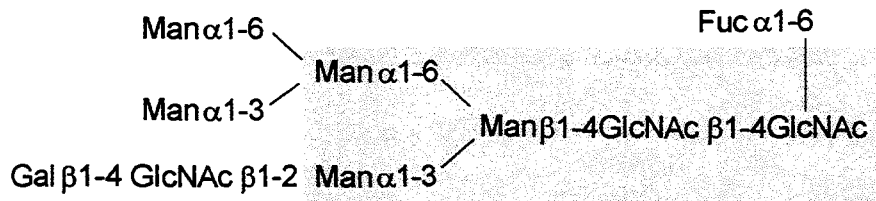
- i) les *N*-glycosylprotéines pour lesquelles la liaison engage la fonction hémiacétalique d'un résidu de *N*-acétylglucosamine d'un oligosaccharide et l'azote de la fonction amide d'un résidu d'asparagine d'une protéine (Fig. 5a) : le glycanne est alors nommé *N*-glycanne en référence à la liaison *N*-glycosidique,
- ii) les *O*-glycosylprotéines pour lesquelles la liaison s'établit entre la fonction réductrice d'un monosaccharide (Glucose, *N*-acétylgalactosamine, Xylose, Arabinose, Mannose ) et le groupement hydroxyl d'un acide aminé hydroxylé (Sérine, Thréonine, hydroxyproline, hydroxylysine, tyrosine) (Fig. 5b) : le glycanne est alors nommé *O*-glycanne en référence à la liaison *O*-glycosidique.



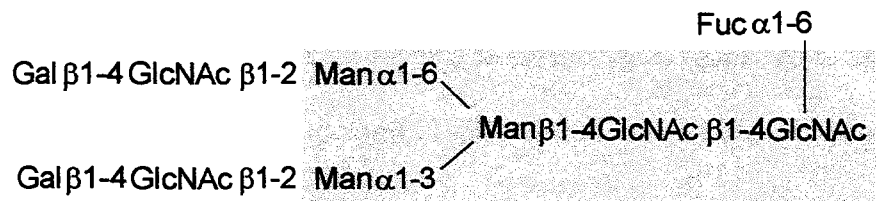
**Figure 6:** Le noyau, structure pentasaccharidique commune à tous les *N*-glycannes.



### Type Oligomannosidique



### Type Hybride



### Type N-acétyllactosaminique

**Figure 7 :** Les trois types de structures glycaniques retrouvées dans les *N*-glycosylprotéines. Le noyau pentasaccharidique commun à toutes les structures est indiqué par un cadre gris.

Alors que pour les *N*-glycosylprotéines, la liaison entre le glycanne et la protéine est unique, on en distingue de nombreuses pour les *O*-glycosylprotéines. Ainsi, en fonction de la nature du monosaccharide mais aussi de l'acide aminé engagé dans la liaison, plusieurs types de *O*-glycosylprotéines seront définis (Tableau 2).

Notons enfin qu'il n'est pas rare de trouver, au sein d'une glycoprotéine, les deux types de glycannes : on parle alors de *N,O*-glycosylprotéine. L'érythropoïétine que nous venons de présenter en est une. En effet, elle renferme trois sites de *N*-glycosylation et un site de *O*-glycosylation.

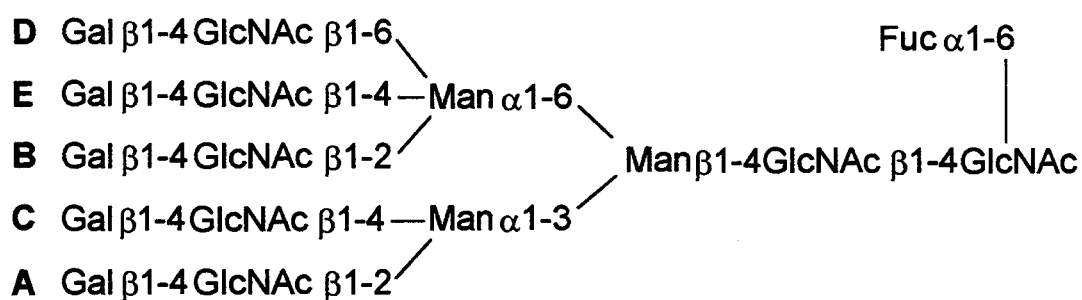
## 2.2.2. Les glycannes liés N-glycosidiquement

### 2.2.2.1. Généralités

L'examen de la structure primaire d'un *N*-glycanne fait apparaître 3 régions distinctes à savoir : le noyau, les antennes et la périphérie.

#### 2.2.2.1.1. le noyau

La première région, appelée noyau (en anglais core), est commune à tous les *N*-glycannes. Il s'agit d'une structure pentasaccharidique (Fig. 6) constituée de 2 résidus de *N*-acétylglucosamine (GlcNAc) liés entre eux par une liaison  $\beta$ -(1→4). L'un de ces 2 résidus forme la liaison *N*-glycosidique avec la protéine. Les 3 autres monosaccharides sont des résidus de mannose (Man) et, de part leur mode de liaison, conduiront à des structures glycaniques ramifiées. Par convention, la liaison  $\alpha$ -(1→6) entre un des deux mannoses terminaux et le mannose central est écrit en haut et donnera naissance à ce que nous appellerons ultérieurement la branche  $\alpha$ -(1→6) ou encore la branche supérieure. Quant à la liaison  $\alpha$ -(1→3) entre le troisième mannose et le mannose central, elle est écrit en bas et sera appelée branche  $\alpha$ -(1→3) ou encore branche inférieure.



**A+B = structure biantennée**

**A+B+C ou A+B+D = structure triantennée**

**A+B+C+D = structure tétraantennée**

**A+B+C+D+E = structure pentaantennée**

**Figure 8 :** L'addition de répétitions *N*-acétyllactosaminiques conduit aux *N*-glycannes bi-, tri-, tétra- et penta-antennés.



### 2.2.2.1.2. les antennes

La seconde région correspond aux antennes et est obtenue par la substitution des 2 mannoses terminaux du noyau par différents monosaccharides. Suivant leur nature, on distingue les 3 types de *N*-glycannes suivants :

i) le type oligomannosidique (Fig. 7) qui correspond à la substitution des 2 mannoses terminaux du noyau par des résidus de mannose uniquement,

ii) le type complexe qui est obtenu par l'addition de chaînons *N*-acétyllactosaminiques (LacNac : Gal $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc) sur au moins un des deux mannoses terminaux du noyau (Fig. 7). On parle alors d'un *N*-glycanne monoantenné. L'addition de chaînons *N*-acétyllactosaminiques supplémentaires conduira dans l'ordre aux *N*-glycannes bi-, tri-, tétra- et penta-antennés (Fig. 8).

iii) quant au type hybride (Fig. 7), il peut être défini comme étant un compromis entre les deux types précédents. En effet, dans ce type de glycannes, le mannose de la branche  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6) est substitué uniquement par des résidus de mannose (caractéristique du type oligomannosidique) alors que le mannose de la branche  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3) est substitué par un ou deux chaînons *N*-acétyllactosaminiques (caractéristique du type complexe).

Pour plus de détails concernant ces différents types de glycannes, voir les revues de Montreuil, 1975, 1980, 1982, 1984; Kornfeld et Kornfeld, 1985.

Il est à signaler que dans certains *N*-glycannes, le résidu de mannose central du noyau est substitué par un résidu de *N*-acétylglucosamine (nommé GlcNAc intercalaire). Toutefois, cela ne constitue pas une antenne au sens où nous l'avons défini ci-dessus.

### 2.2.2.1.3. la périphérie

La troisième région, appelée périphérie, est obtenue par l'addition de certains monosaccharides sur l'une des deux régions précédentes ou sur les deux. Les deux principaux monosaccharides formant la périphérie sont l'acide *N*-acétylneuraminique

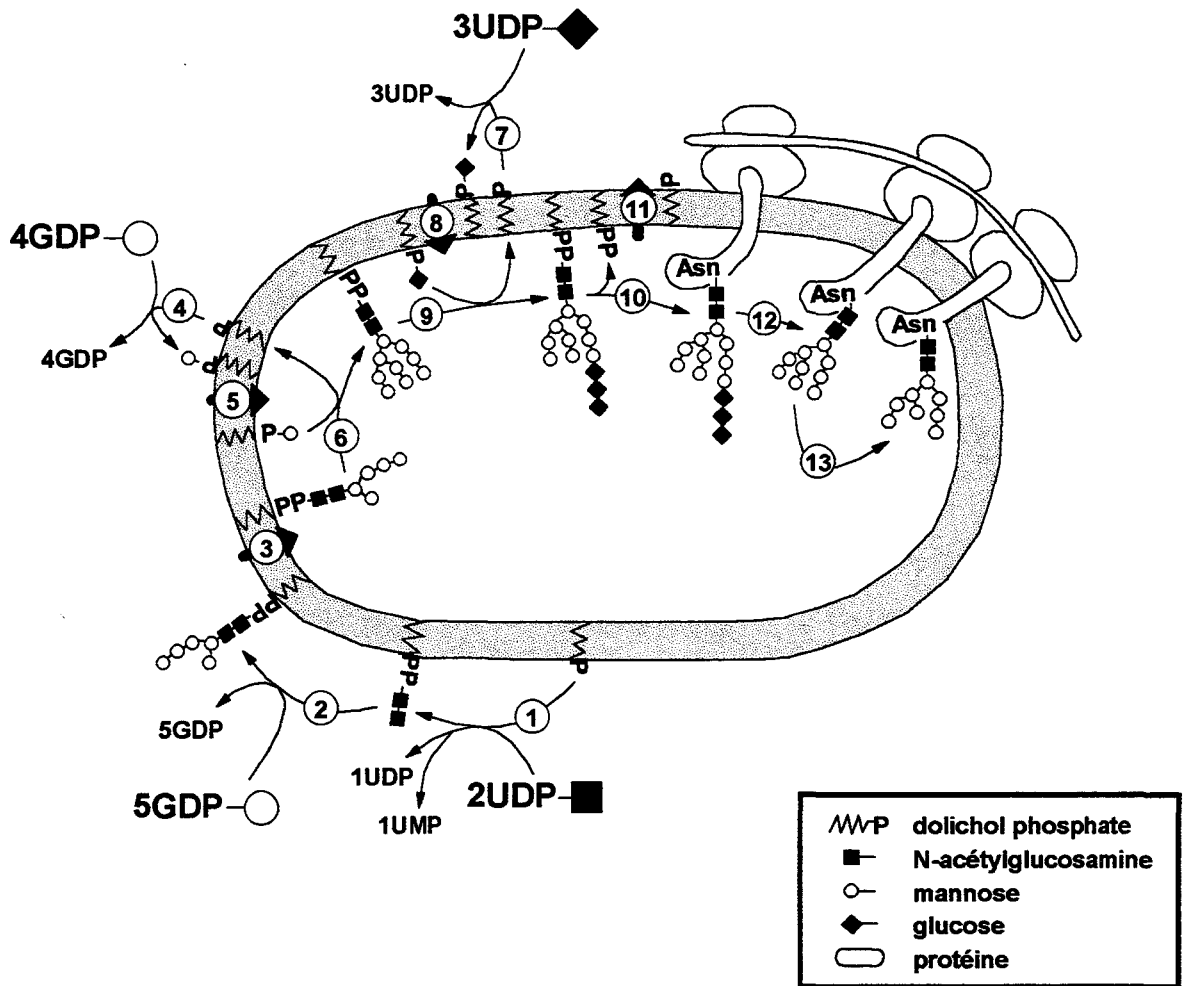
(Neu5Ac) qui appartient à la famille des acides sialiques et le fucose (Fuc). Toutefois, il n'est pas rare de trouver du galactose (Gal) (Coddeville *et al.*, 1992) ou encore de la *N*-acétylgalactosamine (GalNAc). Dans la majorité des cas, l'ajout d'un acide sialique se fait sur un résidu de galactose en position terminale non réductrice d'une antenne grâce à une liaison  $\alpha$ -(2→3) ou  $\alpha$ -(2→6). Cela signifie qu'un *N*-glycane pourra être défini par son nombre d'antennes (mono-, bi-, tri-...) mais aussi par le nombre d'acides sialiques (de un à cinq). De même, un nombre variable de fucose peut être présent sur les *N*-glycannes. On les retrouve au niveau du noyau sur la *N*-acétylglucosamine du point d'attache via une liaison  $\alpha$ -(1→6) qui, chez les mammifères, est la seule à avoir été décrite à ce jour. On les retrouve également au niveau de résidus de *N*-acétylglucosamine constituant les antennes. Dans ce dernier cas, toutes les liaisons sont possibles.

En conclusion, si l'on considère pour le type complexe le nombre d'antennes, la localisation des antennes sur la branche  $\alpha$ -(1→3) ou  $\alpha$ -(1→6), le nombre d'acides sialiques et de fucose ainsi que la présence ou non d'une *N*-acétylglucosamine intercalaire, on se rend compte qu'un très grand nombre de glycannes différents peut être obtenu.

#### **2.2.2.2. Biosynthèse des *N*-glycannes**

La biosynthèse d'une *N*-glycosylprotéine peut être décomposée en 3 étapes :

- i) la synthèse du glycane sous la forme d'un intermédiaire lipidique, le dolichol-pyrophospho-oligosaccharide,
- ii) le transfert en bloc, dans le RER, du *N*-glycane sur la protéine en voie d'élongation,
- iii) la maturation au cours de laquelle le *N*-glycane va subir toute une série de modifications depuis le RER jusqu'au réseau trans-golgien avant que la glycoprotéine mature ne soit sécrétée.



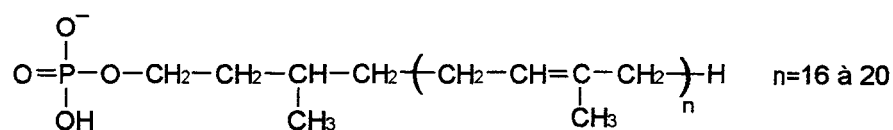
**Figure 9** : Topographie du cycle des dolichols (d'après Abeijon et Hirschberg, 1992).

Les enzymes impliquées à chaque étape de ce cycle sont : 1 : *N*-acétylglucosaminyl-1-P-transférase et *N*-acétylglucosaminyltransférase ; 2 : cinq mannosyltransférases (GDP-Man dépendantes) ; 3 : « flipase » ; 4 et 5 : Man-P-Dol synthétase ; 6 : quatre mannosyltransférases (Man-P-Dol dépendantes) ; 7 et 8 : Glc-P-Dol synthétase ; 9 : glucosyltransférases ; 10 : oligosaccharidyltransférase ; 11 : Dol-pyrophosphatase ; 12 :  $\alpha$ -glucosidase I et II ; 13 : RE  $\alpha$ 1,2-mannosidase.

(voir les revues générales de Snider, 1984; Kornfeld et Kornfeld, 1980, 1985; Schachter, 1986; Abeijon et Hirschberg, 1992).

#### 2.2.2.2.1. Synthèse du N-glycane

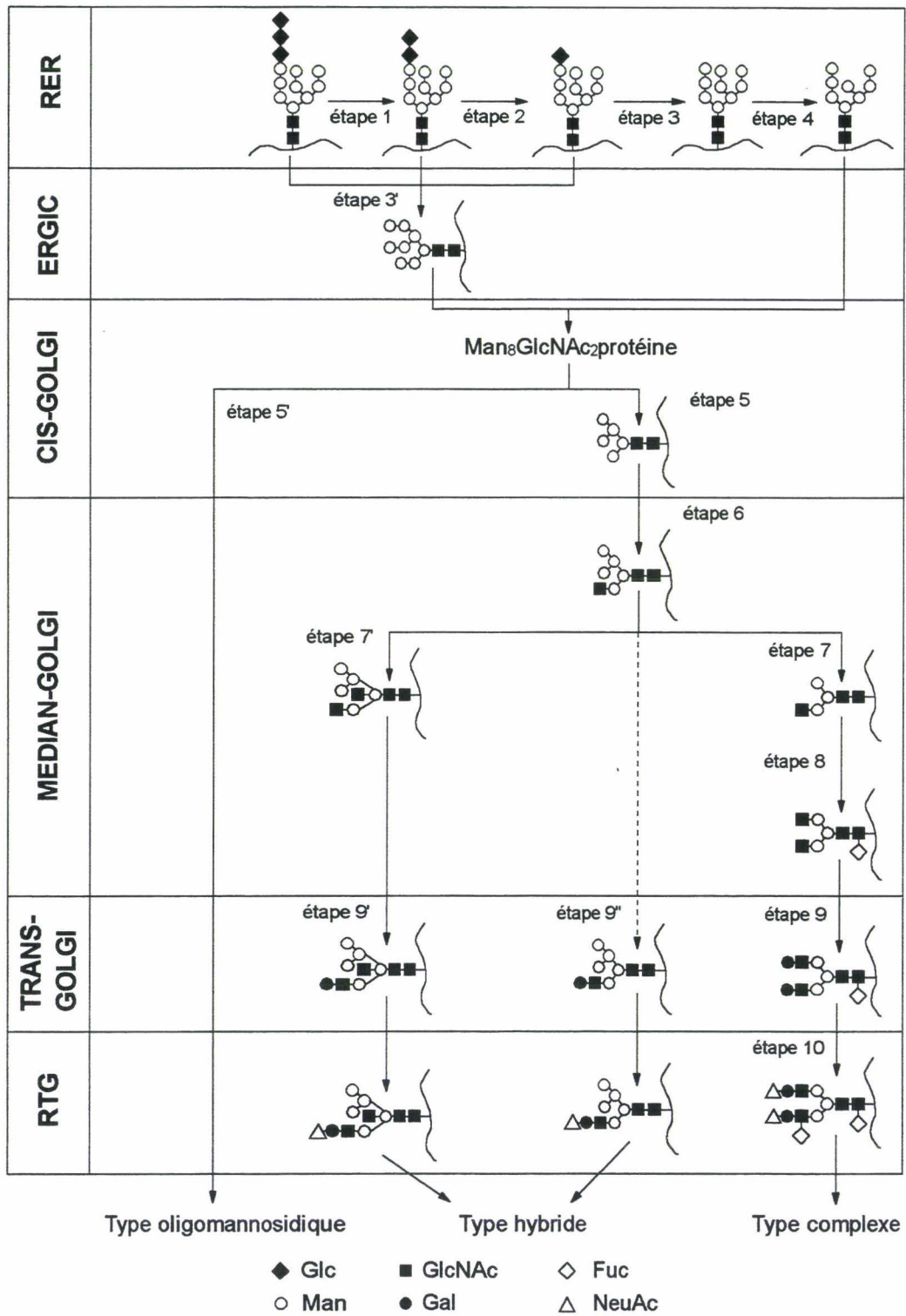
La synthèse du *N*-glycane (Fig. 9) débute côté cytosolique du R.E.R. par le transfert d'un résidu de Phospho-*N*-acétylglucosamine (à partir d'UDP-GlcNAc) sur un dolichol-phosphate (Dol-P) qui est un accepteur lipidique (structure ci-dessous) intégré à la membrane du RER de toutes les cellules eucaryotes (Snider et Rogers, 1984; Kean, 1991; Abeijon et Hirschberg, 1992).



La liaison formée est une liaison pyrophosphate et on obtient le GlcNAc-P-P-Dol avec libération d'une molécule d'UMP.

Un second résidu de *N*-acétylglucosamine (à partir d'UDP-GlcNAc) est ensuite transféré sur le GlcNAc-P-P-Dol pour former le GlcNAc<sub>2</sub>-P-P-Dol avec libération cette fois-ci d'UDP.

A partir de GDP-Man, 5 mannoses vont être ajoutés au GlcNAc<sub>2</sub>-P-P-Dol pour former le Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-P-P-Dol (étape 2). A ce stade, par un mécanisme de « flip-flop » encore mal connu, l'intermédiaire Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-P-P-Dol s'oriente vers la face interne du RER (étape 3) (Snider et Roger, 1984). En parallèle, du Man-P-Dol est synthétisé côté cytosolique par transfert de mannose (à partir de GDP-Man) sur le Dol-P (étape 4). Après passage de ce dernier dans la lumière du RER par un mécanisme « de flip-flop » (étape 5), 4 mannoses vont être additionnés au Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-P-P-Dol pour donner le Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-P-P-Dol (étape 6). De même, il y a synthèse côté cytosolique de Glc-P-Dol à partir d'UDP-Glc (étape 7), retournement de ce dernier dans la lumière du RER (étape 8) et transfert de 3



**Figure 10** : Schéma simplifié de la biosynthèse des *N*-glycoprotéines

Les enzymes impliquées à chaque étape sont : étape 1 :  $\alpha$ -glucosidase I ; étape 2 et 3 :  $\alpha$ -glucosidase II ; étape 3' : endo- $\alpha$ -D-mannosidase ; étape 4 :  $\alpha$ -mannosidase ; étape 5 :  $\alpha$ -D-mannosidase I ; étape 5' : pas de processing ; étape 6 : *N*-acétylglucosaminyltransférase I ; étape 7 :  $\alpha$ -D-mannosidase II ; étape 7' : *N*-acétylglucosaminyltransférase III ; étape 8 : *N*-acétylglucosaminyltransférase II, III, IV, V,  $\alpha$ 1,6-fucosyltransférase ; étape 9, 9' et 9'' :  $\beta$ 1,4-galactosyltransférase ; étape 10 : fucosyltransférase,  $\alpha$ 2,3/6sialyltransférase.

glucoses sur le  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$  pour générer le  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$  (étape 9) (Hannover et Lennarz, 1982; Snider et Rogers, 1984).

#### 2.2.2.2.2. Transfert sur la protéine

L'oligosaccharide  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$  va ensuite être transféré en bloc sur un résidu d'asparagine d'une protéine en voie d'élongation grâce à l'oligosaccharidyltransférase qui catalyse la liaison  $\beta 1\text{-N}$  glycosidique entre le résidu de *N*-acétylglucosamine en position terminale réductrice et l'azote du groupement amide de l'asparagine. Tous les résidus d'asparagine d'une protéine ne peuvent être glycosylés. En effet, ce résidu doit être présent dans une séquence tripeptidique consensus, appelée sequon, de type  $\text{Asn-X-Thr/Ser}$  où X représente un acide aminé différent de la proline (Pless et Lennarz, 1977; Hart *et al.*, 1979; Bause, 1983). Toutefois, tous les sequons potentiels ne sont pas glycosylés ce qui signifie que leur présence est une condition nécessaire mais non suffisante. Ainsi, d'autres facteurs structuraux, comme la structure en coude  $\beta$  du chaînon peptidique, favorisent la réaction de transfert en augmentant l'accessibilité sur le site de *N*-glycosylation. C'est ainsi que les travaux de Grabenhorst *et al.* (1993) portant sur la synthèse de glycoprotéines recombinantes ont permis d'établir une séquence peptidique de neuf acides aminés (GWN $\text{E}$ TIVGG) créant les conditions optimales à la *N*-glycosylation.

#### 2.2.2.2.3. La maturation dans le R.E.R. et l'appareil de Golgi

La maturation des chaînes glycaniques (Fig. 10) correspond au passage de la structure glycanique  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  vers l'un des 3 types de *N*-glycannes décrit précédemment (oligomannosidiques, hybrides ou complexes). Elle débute dans la lumière du RER par l'action successive des glucosidases I et II (Reitman *et al.*, 1982 ; Hettkamp *et al.*, 1984) (étape 1 à 3) et de l' $\alpha$ -mannosidase du R.E.R. (Kaushal *et al.*, 1993) (étape 4) pour conduire à la structure  $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ -protéine qui sera alors transportée dans

l'appareil de Golgi (Lodish et Kong, 1984 ; Lodish, 1988). Avant le transfert dans le cis-Golgi, il y a transfert dans un compartiment intermédiaire appelé ERGIC, pour Endoplasmic Reticulum Golgi Intermediate Compartment, dans lequel aucune activité enzymatique de type glycosidasique ou transférasique n'a encore été décelée. Toutefois, une enzyme, l'endo- $\alpha$ -D-mannosidase (Lubas et Spiro, 1988) dont le rôle serait de transformer le chaînon  $\text{GlcMan}_9\text{GlcNAc}_2$  en  $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$  (étape 3') a été décrite. La présence, hors du R.E.R., de ce chaînon glycanique pose plusieurs questions. S'agit-il d'une « défaillance » des glucosidases du R.E.R. et dans ce cas l'endo- $\alpha$ -D-mannosidase constituerait un moyen de la corriger ou alors s'agit-il d'un signal pour diriger la glycoprotéine vers un processus de maturation particulier ?

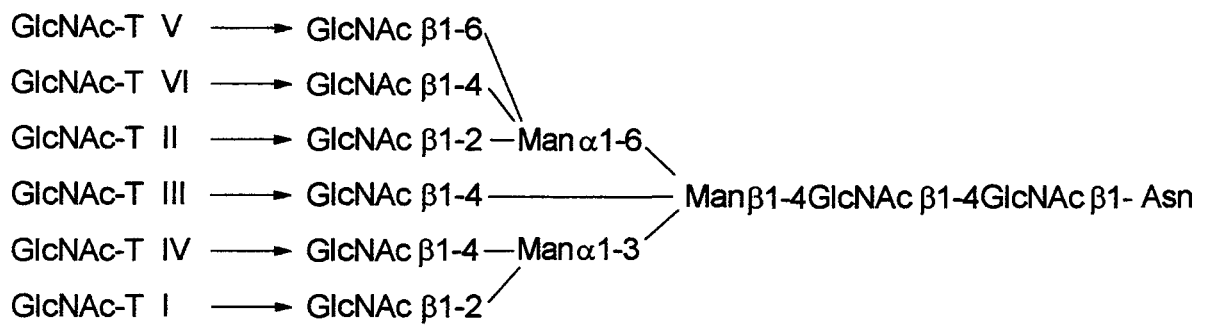
Une fois parvenu dans le cis-Golgi, deux destinées du chaînon  $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$  sont possibles pour aboutir à un glycanne soit de type oligomannosidique soit de type hybride ou complexe.

#### **BIOSYNTHESE DES GLYCANNES DE TYPE OLIGOMANNOSIDIQUE**

Le processus de maturation va rester « bloqué » à ce stade et aucune autre activité glycosidasique ou glycosyltransférasique n'aura lieu sur le chaînon  $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$  (étape 5'). Pour expliquer cet arrêt de maturation, l'une des hypothèses les plus vraisemblables serait que le chaînon  $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$  interagirait avec le squelette protéique interdisant ainsi l'accès aux glycosidases et donc aux glycosyltransférases. Ainsi, la protéine, en autorisant ou non le contact de la copule glucidique avec les enzymes présents dans le Golgi, jouerait un rôle important dans la régulation de la glycosylation.

#### **BIOSYNTHESE DES GLYCANNES DE TYPE HYBRIDE ET/OU COMPLEXE**

La première enzyme rencontrée dans le cis-Golgi par le chaînon  $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$  est l' $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2) mannosidase I qui va conduire à la formation du chaînon  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  (étape



**Figure 11 :** Les six N-acétylglucosaminyltransférases (GlcNAc-T I à VI) impliquées dans la synthèse des N-glycannes de type complexe et dans l'addition d'un résidu de N-acétylglucosamine intercalaire (Schachter, 1991).



5). Il y a ensuite transfert dans le Golgi-médian où se trouvent localisés les 6 types de *N*-acétyl glucosaminyltransférases (nommées GlcNAc-T I, GlcNAc-T II, GlcNAc-T III, GlcNAc-T IV, GlcNAc-T V et GlcNAc-T VI) décrites à ce jour (Fig. 11), l' $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2) mannosidase II et la core fucosyltransférase. L'action de la GlcNAc-T I (Fig. 10, étape 6) va générer le chaînon GlcNAcMan<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub> pour lequel deux évolutions sont possibles:

- si l' $\alpha$ -mannosidase II agit avant la GlcNAc-T III (Fig. 10, étape 7), on aura formation d'un chaînon GlcNAcMan<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub> qui évoluera ensuite vers la synthèse d'un glycanne de type complexe.

- si au contraire, la GlcNAc-T III, responsable du transfert d'un résidu de *N*-acétylglucosamine (sous la forme d'UDP-GlcNAc) en  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) sur le mannose 1 du noyau (ce résidu de *N*-acétylglucosamine sera nommé par la suite *N*-acétylglucosamine intercalaire), agit la première sur le chaînon GlcNAcMan<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub> (Fig. 10, étape 7'), on aboutira à la formation d'un glycanne de type hybride car l'action ultérieure de l' $\alpha$ -mannosidase II est alors impossible. Ce schéma constitue la première voie de biosynthèse d'un glycanne de type hybride. La seconde voie fait intervenir la galactosylation (par une galactosyltransférase) du résidu de *N*-acétylglucosamine en position terminale non réductrice du chaînon GlcNAcMan<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub> (étape 9''). Cela aurait pour effet d'interdire l'action ultérieure de l' $\alpha$ -mannosidase ainsi que celle des *N*-acétylglucosaminyltransférases II, III, IV, V et VI (Chawla et Hughes, 1991). Cette voie est représentée en pointillé dans la Figure 10 car elle pose le problème de l'existence de la galactosyltransférase dans le golgi médian.

A partir du chaînon GlcNAcMan<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub>, la core fucosyltransférase va pouvoir agir ainsi que les 4 autres GlcNAc-T (II, III, IV et V) (Fig. 10, étape 8) pour conduire à des glycannes complexes bi-, tri-, tétra- ou penta-antennés avec ou sans *N*-acétylglucosamine intercalaire selon le schéma proposé par H. Schachter (1991) (Fig. 11).

Dans le trans-golgi, des résidus de galactose (sous la forme d'UDP-Gal) vont être ajoutés sur les N-acétylglucosamine terminales grâce à une galactosyltransférase (Fig. 10, étape 9). La galactosylation concerne également les structures glycaniques de type hybride (Fig. 10, étape 9'). Enfin le transit dans le réseau trans-golgien (TGN: Trans Golgi Network) permet l'ajout de monosaccharides qui constitueront la périphérie. C'est ainsi qu'une sialyltransférase permettra le greffage en  $\alpha$ -(2→3) ou  $\alpha$ -(2→6) d'un acide sialique (sous la forme de CMP-acide sialique) sur un galactose terminal ou encore qu'une fucosyltransférase permettra le greffage d'un fucose (sous la forme d'un GDP-Fuc) en  $\alpha$ -(1→2, 3 ou 4) d'un résidu de N-acétylglucosamine ou en  $\alpha$ -(1→2) d'un résidu de galactose.

Avant de clore ce chapitre, il convient de signaler que certaines structures glycaniques peuvent renfermer un ou plusieurs chaînon(s) N-acétyllactosaminique(s) (appelés également répétitions N-acétyllactosaminiques ou LacNAc) lié(s) par une liaison  $\beta$ -(1→3) à un résidu de galactose terminal d'une antenne. L'enzyme responsable du transfert préalable d'un résidu de N-acétylglucosamine sur le Galactose est la  $\beta$ -(1→3)-N-acétylglucosaminyltransférase et a été clonée (Sasaki *et al.*, 1997). Si la spécificité de cette enzyme a été précisée (Elices et Goldstein, 1990), sa localisation dans l'appareil de Golgi n'est toujours pas connue. Toutefois, si l'on considère que la galactosyltransférase est localisée dans le trans-Golgi, on peut légitimement penser que la  $\beta$ -(1→3)-N-acétylglucosaminyltransférase est également localisée dans ce compartiment puisqu'elle ne peut pas agir avant qu'un résidu de Galactose n'ait été transféré sur le glycanne.

### 2.2.2.3. Régulation de la biosynthèse

L'assemblage d'une structure oligosaccharidique complexe ne se fait pas au hasard. C'est ainsi que la lactoferrine bovine, qui contient cinq sites de N-glycosylation dont un n'est pas glycosylé, possède des sites exclusivement substitués par des structures de type

oligomannosidique alors que d'autres sont préférentiellement porteurs de glycanes de type *N*-acétyllactosaminique (Spik *et al.*, 1993). Dans cet exemple, il ne peut être invoqué un trafic intracellulaire différent puisque ces cinq sites appartiennent à la même protéine!

De plus, tous les chaînons  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  présents sur un même site de glycosylation ne subiront pas tous une maturation identique (comme pourrait le laisser supposer la Fig. 10). Citons l'exemple de l'orosomucoïde (Treueheit *et al.*, 1992) ou encore de l'érythropoïétine humaine urinaire (Rahbek-Nielsen *et al.*, 1997) pour lesquelles une trentaine de structures glycaniques différentes ont été décrites. Ce phénomène est connu sous le nom de microhétérogénéité glycanique.

Comme nous le montre ces trois exemples, la glycosylation d'une protéine est sous la dépendance de multiples facteurs. Si la plupart restent méconnus à ce jour, trois d'entre eux sont admis de tous. Nous citerons successivement, l'activité relative des glycosyltransférases pour un même substrat, la présence d'un signal GO qui permettra l'action ultérieure d'une enzyme ou NO-GO qui au contraire l'interdira (Schachter, 1991) et l'influence exercée par la structure tridimensionnelle du squelette protéique (Green, 1982 ; Schachter, 1986 ; Carver, 1987).

i) l'activité relative des glycosyltransférases : le plus bel exemple est donné par les étapes 7 et 7' où, sur la structure  $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$ -protéine, pourront agir deux enzymes : l' $\alpha$ -mannosidase II et la GlcNAc-T III. Si l'activité relative de l' $\alpha$ -mannosidase II est la plus forte, on aboutit à la synthèse d'un glycanne de type complexe alors que si c'est celle de la GlcNAc-T III, on obtient un glycanne de type hybride.

ii) la notion de signaux « GO et NO-GO » : la présence d'une *N*-acétylglucosamine intercalaire bloquera l'action des autres *N*-acétylglucosaminyltransférases ; de même la présence d'un résidu de galactose bloquera l'action de ces enzymes ainsi que celle de la core fucosyltransférase. Ces 2 monosaccharides

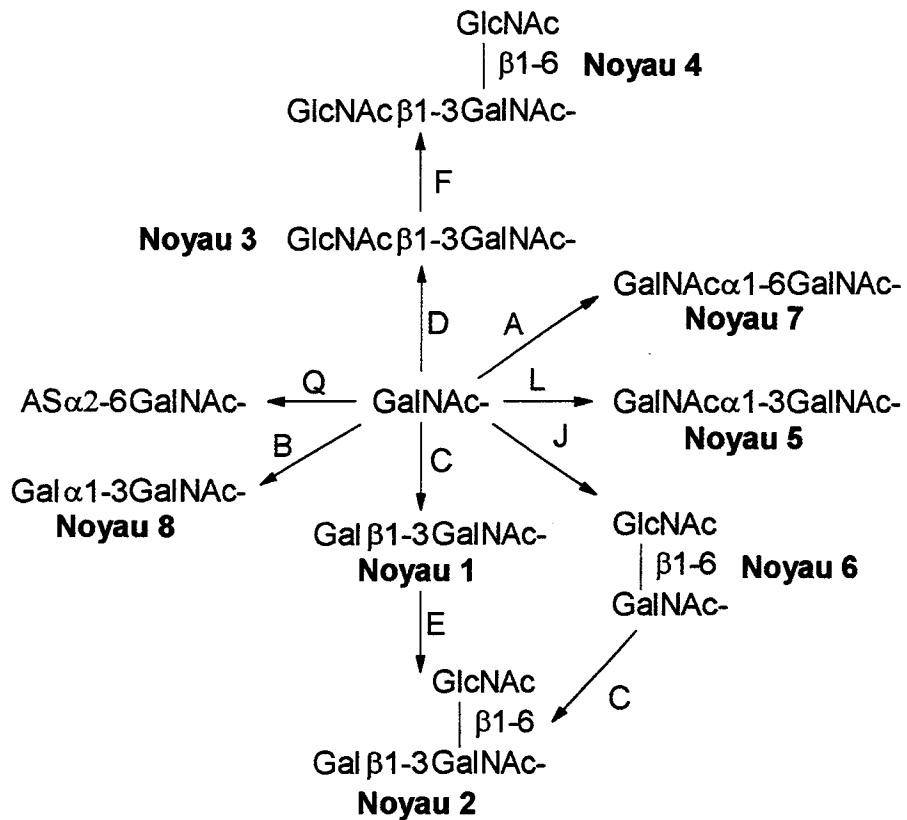
représenteront des signaux NO-GO. A l'inverse, la N-acétylglucosamine lié en  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 2) du Man de la branche  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3) permettra l'action de la mannosidase II, de la core-fucosyltransférase et des différentes N-acétylglucosaminyltransférases. Ce monosaccharide constitue un signal GO.

iii) la structure tridimensionnelle de la protéine : nous avons déjà fait allusion à l'influence de la structure tridimensionnelle de la protéine sur la maturation des chaînes glycaniques lorsque nous avons parlé de la biosynthèse des glycanes de type oligomannosidique. Un autre exemple est celui de la glycosylation d'une IgG monoclonale humaine (Savvidou *et al.*, 1984) qui porte deux sites de N-glycosylation sur les Asn 107 et 297. Alors que les N-glycanes de type complexe du site 107 possèdent tous un résidu de N-acétylglucosamine intercalaire, 73% des glycanes du site 297, également de type complexe, n'en possèdent pas. L'une des explications serait que les interactions de la copule glucidique du site 107 avec la chaîne protéique lui permettrait d'adopter une conformation beaucoup plus favorable à l'action de la GlcNAc-T III que les glycanes du site 297.

Camphausen *et al.* (1995) présentent une revue générale concernant le rôle de la chaîne polypeptidique.

### 2.2.3. Les glycanes liés O-glycosidiquement

Alors que la liaison d'un N-glycane sur une protéine est unique (GlcNAc ( $\beta$ 1 $\rightarrow$ N) Asn), nous avons vu qu'il en existait de multiples pour les O-glycanes (page 11) et que pour chaque liaison O-glycosidique différente, était défini un type de O-glycane. Nous ne présenterons dans notre exposé que les O-glycanes de type mucine qui sont les seuls à avoir été décrits dans l'érythropoïétine (pour les autres types de O-glycanes, voir les revues générales de Hounsell et Feizi (1982), Schachter et Brockhausen (1992) et Brockhausen (1995).



**Figure 12 :** Biosynthèse des noyaux *O*-glycanniques.

Les glycosyltransférases impliquées sont : A : core 7 α6-GalNAc-T ; B : core 8 α3-Gal-T ; C : core 1 β3-Gal-T ; D : core 3 β3-GlcNAc-T ; E : core 2 β6-GlcNAc-T ; F : core 4 β6-GlcNAc-T ; L : core 5 α3-GalNAc-T ; J : core 6 β6-GlcNAc-T ; Q : α6-AS-T I (-T= transférase) (d'après Brockhausen, 1995).

### 2.2.3.1. Structure des O-glycannes de type mucine

Les O-glycannes de type mucine sont reliés à l'axe peptidique par une liaison impliquant la fonction hémi-acétalique d'un résidu de *N*-acétylgalactosamine et la fonction alcool d'un résidu de sérine ou de thréonine. Une de leurs caractéristiques est la très grande hétérogénéité observée au niveau de la longueur des chaînes glycaniques qui varie entre 1 et 20 monosaccharides selon l'origine de la mucine. Les principaux monosaccharides entrant dans la composition de ces O-glycannes sont la *N*-acétylgalactosamine, la *N*-acétylglucosamine, le galactose, le fucose. De plus, on note très souvent la présence d'un acide sialique.

A partir de ces quelques monosaccharides, un très grand nombre de structures O-glycaniques va pouvoir être synthétisé. Comme pour les *N*-glycannes, on distingue trois régions structurales distinctes dans les chaînes O-glycaniques qui sont, le noyau ou core, le squelette et la périphérie (Hounsell et Feizi, 1982).

#### 2.2.3.1.1. Les noyaux

Le seul élément structural commun à toutes les chaînes O-glycaniques de type mucine est la *N*-acétylgalactosamine liée au peptide. Ce résidu va être substitué par un ou deux monosaccharides. En fonction de la nature de ces monosaccharides et du type de liaison glycosidique, huit noyaux différents ont été décrits (Fig. 12).

Parmi les noyaux obtenus par l'addition d'un seul monosaccharide sur la *N*-acétylgalactosamine du point d'attache, il y a:

- i) les noyaux de classe 1 et 8 qui sont obtenus par addition d'un résidu de galactose :  
pour le noyau de classe 1, la liaison osidique entre les 2 monosaccharides est une liaison  $\beta$ -(1→3) (grâce à la core 1  $\beta$ 3-Gal-transférase) alors que pour la classe 8, il s'agit d'une liaison  $\alpha$ -(1→3) (grâce à la core 8  $\alpha$ -3-Gal-transférase),

- ii) les noyaux de classe 3 et 6 qui sont obtenus par addition d'une *N*-acétylglucosamine : pour le noyau de classe 3, la liaison osidique entre les 2 monosaccharides est une liaison  $\beta$ -(1→3) (grâce à la core 3  $\beta$ 3-GlcNAc-transférase) alors que pour la classe 6, il s'agit d'une liaison  $\beta$ -(1→6) (grâce à la core 6  $\beta$ 6-GlcNAc-transférase),
- iii) les noyaux de classe 5 et 7 qui sont obtenus par addition d'une *N*-acétylgalactosamine : pour le noyau de classe 5, la liaison osidique entre les 2 monosaccharides est une liaison  $\alpha$ -(1→3) (grâce à la core 5  $\alpha$ 3-GalNAc-transférase) alors que pour la classe 7, il s'agit d'une liaison  $\alpha$ -(1→6) (grâce à la core 7  $\alpha$ 6-GalNAc-transférase).

Deux noyaux sont obtenus par l'ajout de deux monosaccharides sur la *N*-acétylgalactosamine du point d'attache. Il s'agit du noyau de classe 2 qui correspond à l'addition d'une *N*-acétylglucosamine en  $\beta$ -(1→6) sur la *N*-acétylgalactosamine du noyau 1 (grâce à la core 2  $\beta$ 6-GlcNAc-transférase) et du noyau de classe 4 qui correspond à l'addition d'une *N*-acétylglucosamine en  $\beta$ -(1→6) sur la *N*-acétylgalactosamine du noyau 3 (grâce à la core 4  $\beta$ 6-GlcNAc-transférase).

#### 2.2.3.1.2. Les squelettes

Le squelette des *O*-glycannes est obtenu par l'addition sur le noyau de résidus de galactose et de *N*-acétylglucosamine (sous la forme d'un chaînon *N*-acétyllactosaminique). En fonction de la liaison entre le galactose et la *N*-acétylglucosamine, on distingue deux grands types de squelettes (Feizi, 1982 ; Hounsell *et al.*, 1982):

- i) le type 1 ou lacto dans lequel la liaison glycosidique est une liaison  $\beta$ -(1→3) (Gal $\beta$ -(1→3)GlcNAc)

**Tableau 3** : Structure des oligosaccharides ayant une activité antigénique.

Antigène	Structure
A	GalNAc $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)[Fuc $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2)]Gal $\beta$ -
B	Gal $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)[Fuc $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2)]Gal $\beta$ -
B linéaire ; Antigène de Galili	Gal $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)Gal-
H	[Fuc $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2)]Gal $\beta$ -
T	Gal $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)GalNAc $\alpha$ -Ser/Thr
Tn	GalNAc $\alpha$ -Ser/Thr
Sialyl-Tn	NeuAc $\alpha$ -(2 $\rightarrow$ 6)GalNAc $\alpha$ -Ser/Thr
S <sup>d</sup> (Cad)	GalNAc $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)[AS $\alpha$ -(2 $\rightarrow$ 3)]Gal $\beta$ -
i	Gal $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)Gal $\beta$ -
I	Gal $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)[Gal $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)]Gal $\beta$ -
Le <sup>a</sup>	Gal $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)[Fuc $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)]GlcNAc $\beta$ -(1 $\rightarrow$ -
Le <sup>b</sup>	[Fuc $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2)]Gal $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)[Fuc $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)]GlcNAc $\beta$ -(1 $\rightarrow$ -
Le <sup>x</sup>	Gal $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)[Fuc $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)]GlcNAc $\beta$ -(1 $\rightarrow$ -
Le <sup>y</sup>	[Fuc $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2)]Gal $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)[Fuc $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)]GlcNAc $\beta$ -(1 $\rightarrow$ -
Sialyl-Le <sup>x</sup>	NeuAc $\alpha$ -(2 $\rightarrow$ 3)Gal $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)[Fuc $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)]GlcNAc $\beta$ -(1 $\rightarrow$ -
Forssman	GalNAc $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)GalNAc $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)Gal-

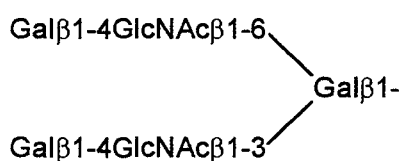


- ii) le type 2 ou néolacto dans lequel la liaison glycosidique est une liaison  $\beta$ -(1→4) (Gal $\beta$ -(1→4)GlcNAc).

Ces deux types de chaînes peuvent être linéaires ou ramifiées (Hounsell et Feizi, 1982) et sont antigéniquement distincts (Kabat, 1982). Ainsi, la structure *O*-glycannique obtenue par l'enchaînement linéaire de chaînons *N*-acétyllactosaminiques de type 2 définit l'antigène i



alors que la présence des mêmes chaînons, mais sous forme ramifiée, définit l'antigène I (Kabat, 1982) :



#### 2.2.3.1.3. La périphérie

Elle est obtenue par l'addition de monosaccharides sur les chaînes *O*-glycanniques décrites précédemment.

Chez les mammifères, les monosaccharides qui constituent la périphérie sont essentiellement des résidus d'acide sialique (liaison  $\alpha$ -(2→3) ou  $\alpha$ -(2→6)), de fucose (liaison  $\alpha$ -(1→2, 3 ou 4)), de *N*-acétylgalactosamine (liaison  $\alpha$ -(1→3 ou 6) ou  $\beta$ -(1→4)), de *N*-acétylglucosamine (liaison  $\alpha$ -(1→4)) et de galactose (liaison  $\alpha$ -(1→3)).

La présence de ces monosaccharides périphériques confère aux *O*-glycannes de nombreuses activités antigéniques (Tableau 3). Les mieux caractérisées sont celles correspondantes aux activités de groupe sanguin A, B, O et Lewis (Lloyd *et al.*, 1968; Morgan et Watkins, 1969; Rovis *et al.*, 1973; Watkins, 1980, 1987; Lhermitte *et al.*, 1981; Schachter et Brockhausen, 1992).

### 2.2.3.2. La biosynthèse des O-glycannes

Deux points essentiels distinguent la synthèse des O-glycosylprotéines de celle des N-glycosylprotéines. Tout d'abord, la O-glycosylation correspond à une modification post-traductionnelle (la protéine doit être complètement synthétisée) alors que la N-glycosylation correspond à une modification co-traductionnelle (la protéine est glycosylée alors qu'elle est en cours d'allongement). Ensuite, contrairement aux N-glycannes, la synthèse des chaînes glycaniques se fait de façon séquentielle sur la protéine (il n'y a pas d'intermédiaire lipidique).

Dans les 2 cas, les monosaccharides sont ajoutés à partir de glycosyl-nucléotides donneurs (UDP-GalNAc, UDP-GlcNAc, UDP-Gal, GDP-Fuc et CMP-Neu5Ac). En ce qui concerne la localisation intracellulaire des glycosyltransférases, de leurs cosubstrats et substrats, deux hypothèses s'opposent. Pour l'une, les glycosyltransférases sont réparties tout le long de l'appareil de Golgi et interviennent de façon séquentielle. Cette compartimentation permettrait le contrôle et la régulation de la O-glycosylation (Spielman *et al.*, 1988). Dans la seconde hypothèse, les glycosyltransférases seraient regroupées au sein de complexes multi-enzymatiques où tout ou partie des processus de maturation des O-glycannes seraient réalisés (Roth *et al.*, 1986).

Cependant, la O-glycosylation apparaît comme un processus séquentiel dans lequel chaque addition d'un nouveau monosaccharide est catalysée par une glycosyltransférase spécifique. De plus, il semble que chez les mammifères, l'initiation de la O-glycosylation soit sous le contrôle d'une famille de polypeptide N-acétylgalactosaminyltransférases, chacune ayant une spécificité de substrat (Hagopian et Eylar, 1968 ; Nehrke *et al.*, 1996). L'expression de ces différentes polypeptide N-acétylgalactosaminyltransférases dépend de l'espèce, du tissu et de la cellule en sachant que plusieurs activités peuvent coexister au sein d'une même cellule (Clausen et Bennett, 1996; Marth, 1996).



La figure 13 présente la biosynthèse des différentes structures glycaniques pouvant être obtenues à partir du noyau 1. De plus, elle illustre, comme pour la biosynthèse des *N*-glycannes, la notion de signaux GO et NO-GO.

### 2.2.3.3. La régulation

Plusieurs facteurs doivent être pris en compte pour envisager le contrôle de la biosynthèse des *O*-glycannes. Parmi les principaux, citons:

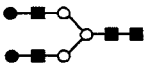
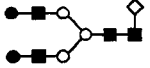
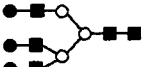
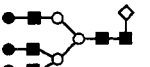
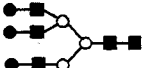
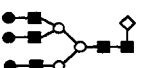
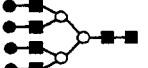
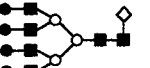
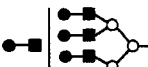
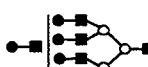
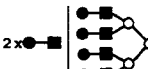


- i) l'activité relative et la spécificité des enzymes pour leur substrat,
- ii) la compartimentation cellulaire qui permettra ou non l'association enzyme-substrat-cosubstrat (glycosylnucléotides),
- iii) la régulation génique (expression ou non de glycosyltransférases dans une cellule),
- iv) la régulation des activités glycosyltransférales via la concentration en ions divalents (la plupart des glycosyltransférases ont besoin de cations divalents comme  $Mg^{2+}$  ou  $Mn^{2+}$ ) ou le pH,
- v) la structure tridimensionnelle de la protéine qui permettra ou non, l'action des glycosyltransférases via un encombrement stérique.

### 2.2.4. La glycosylation de l'érythropoïétine humaine

Au cours de sa biosynthèse, la chaîne protéique de l'érythropoïétine est *O*- et *N*-glycosylée. La *N*-glycosylation a lieu sur les résidus d'asparagine en position 24, 38 et 83 (tous trois présents dans un sequon) alors que la *O*-glycosylation a lieu sur la sérine en position 126. Ces quatre chaînes oligosaccharidiques représentent environ 40% de la masse moléculaire totale de la glycoprotéine (Rahbek-Nielsen *et al.*, 1997).

La difficulté d'étudier la structure des glycannes de l'érythropoïétine provient du fait que cette hormone n'est présente dans le sérum et dans l'urine qu'en très faible quantité (130-230 pg/ml de sérum humain selon Choi *et al.*, 1996). Pour des raisons évidentes de

**Tableau 4 :** Structure des *N*-glycannes désialylés de l'érythropoïétine humaine urinaire.

	Tsuda <i>et al.</i> (1988)		Rahbek-Nielsen <i>et al.</i> (1997)	Takeuchi <i>et al.</i> (1988)
	a <sup>1</sup>	b <sup>1</sup>		
 ou 	48,4	13,4	8	9,0
 ou  ou  ou 	26,5	24,6	30	23,6
 ou 	25,1	62,0	55	59,9
 ou 	nd	nd	7	6,9
 2x  2x         ou 	nd	nd	nd	0,6

<sup>1</sup> a et b correspondent à deux individus donneurs différents

facilité de collecte et de concentration de l'urine (comparé au sérum), toutes les études structurales de l'érythropoïétine humaine ont été réalisées à partir de celle isolée de l'urine. S'il est vraisemblable que la structure primaire de la protéine ne soit pas affectée au cours du processus d'élimination rénale de la molécule, Takeuchi et Kobata (1991) pensent que les glycannes subissent certaines modifications structurales.

#### **2.2.4.1. Structure des N-glycannes de l'érythropoïétine humaine urinaire**

Les N-glycannes de l'érythropoïétine humaine urinaire renferment de la N-acétylglucosamine, du mannose, du galactose, du fucose et de l'acide N-acétylneuraminique et sont de type complexe. La majorité des chaînes glycaniques sont tétraantennées (les structures biantennées et triantennées également présentes sont minoritaires) (Tsuda *et al.*, 1988 ; Takeuchi et Kobata, 1991 ; Rahbek-Nielsen *et al.*, 1997) et on note pour certains glycannes tétraantennés, la présence de répétitions N-acétyllactosaminiques (Takeuchi *et al.*, 1988 ; Rahbek-Nielsen *et al.*, 1997).

La majorité des chaînes glycaniques porte également un résidu de fucose sur la N-acétylglucosamine du point d'attache (Takeuchi *et al.*, 1988 ; Rahbek-Nielsen *et al.*, 1997).

Tsuda *et al.* (1988) ont rapporté l'existence de motif Gal $\beta$ 1-3GlcNAc (série lacto) en proportion non négligeable au sein d'une structure tétraantennée fucosylée mais cela n'a jamais été confirmé.

Chaque chaîne oligosaccharidique est sialylée. Les acides sialiques, représentés uniquement par l'acide N-acétylneuraminique, sont liés aux galactoses terminaux soit par une liaison  $\alpha$ -(2 $\rightarrow$ 3) ou  $\alpha$ -(2 $\rightarrow$ 6) dans les proportions 4:1 selon Takeuchi et Kobata (1991) et 3:2 selon Takeuchi *et al.* (1988). Ce haut degré de sialylation explique la forte acidité de la molécule (pHi=3,5 - 4) (Mayeux et Casadevall, 1990).

Gal  $\beta$ 1-3GalNAc-

Neu5Ac $\alpha$ 2-3Gal  $\beta$ 1-3GalNAc-

Neu5Ac  
| $\alpha$ 2-6  
Gal  $\beta$ 1-3GalNAc-

Neu5Ac  
| $\alpha$ 2-6  
Neu5Ac $\alpha$ 2-3Gal  $\beta$ 1-3GalNAc-

**Figure 14** : Structures des *O*-glycannes de l'érythropoïétine humaine urinaire.

L'étude de chacun des sites de *N*-glycosylation, entreprise par Rahbek-Nielsen *et al.* (1997), a révélé quelques différences significatives dans l'antennarité et l'hétérogénéité des glycanes liés à chacun de ces sites. Ainsi, le site Asn-24 contient un mélange de structures biantennées fucosylées, triantennées fucosylées, tétraantennées fucosylées et tétraantennées fucosylées avec une répétition *N*-acétyllactosaminique dans les proportions respectives 25:37:36:2. Par contre, les sites Asn-38 et 83 sont principalement occupés par une structure tétraantennée fucosylée (66% et 62% respectivement), accompagnée d'une structure triantennée fucosylée (30% et 24% respectivement) ainsi que d'une structure tétraantennée fucosylée possédant une répétition *N*-acétyllactosaminique (5% et 10% respectivement). Pour expliquer ces différences, il faut prendre en considération l'influence que peuvent avoir sur les profils glycaniques les différentes sources d'érythropoïétine humaine urinaire et les procédures de purification mises en jeu. En effet, comme cela a été montré par Tsuda *et al.* (1988) des profils glycaniques sensiblement différents ont été obtenus pour des érythropoïétines isolées de différents individus. De plus, si l'on prend en compte les travaux de Takeuchi et Kobata (1991) qui révèlent que les *N*-glycanes triantennés entraînent une élimination hépatique préférentielle de l'érythropoïétine, cela signifie que le taux de *N*-glycanes triantennés retrouvés dans l'urine est sous-estimé.

Le tableau 4 présente les différentes structures *N*-glycaniques recensées dans l'érythropoïétine humaine urinaire.

#### **2.2.4.2. Structure des *O*-glycanes de l'érythropoïétine humaine urinaire**

Le seul *O*-glycane de l'érythropoïétine, situé sur la sérine 126, est de type mucine et il est bâti sur un noyau de classe I (page 22) sur lequel vient s'ajouter l'acide *N*-acétylneuraminique (un à deux résidus) (Takeuchi et Kobata, 1991 ; Choi *et al.*, 1996) pour donner les structures présentées dans la figure 14.



Enfin, il est à noter que tous les résidus de sérine en position 126 sont glycosylés (Rahbek-Nielsen *et al.*, 1997).

## **2.3. Rôles biologiques des glycannes**

### **2.3.1. Rappel sur le rôle des glycannes**

Pendant de longues années, l'activité biologique des glycoprotéines n'a été traduite qu'en terme de séquence en acides aminés. Or, les améliorations récentes des techniques de séquençage des oligosaccharides, de biologie moléculaire et de biologie cellulaire, ont permis de se rendre compte que les bases moléculaires de l'activité biologique d'une glycoprotéine ne reposaient pas uniquement sur sa séquence en acides aminés mais dépendaient également de la séquence en monosaccharides de ses glycannes. De cette constatation, Nathan Sharon, l'un des pères de la glycobiologie, déclara en 1975 « We know now that the specificity of many polymers is written in terms of sugar residues not of amino acids or nucleotides ».

Dans une revue générale de 1993 parue dans *Glycobiology*, A. Varki présente de façon exhaustive les différentes propriétés biologiques attribuées aux glycannes.

Dans un souci de clarté, nous avons regroupé les fonctions biologiques des glycannes des glycoprotéines en quatre catégories distinctes que nous allons présenter ci-dessous.

#### **2.3.1.1. Propriétés physico-chimiques**

i) le maintien de la conformation spatiale des molécules : on peut citer le cas des mucines qui grâce à la présence de leurs acides sialiques (chargés négativement) adoptent une structure spatiale en bâton qui leur confère la viscosité nécessaire à la protection des

muqueuses. La désialylation chimique ou enzymatique de ces molécules leur fait adopter immédiatement une structure en pelote (structure globulaire) (Shrogen *et al.*, 1989).

ii) le rôle de protection du squelette protéique : si l'on reprend l'exemple ci-dessus, la dégradation enzymatique des mucines natives est quasiment impossible. Toutefois, sous leur forme désialylée et pelotonnée, les mucines présentent une sensibilité accrue vis à vis des protéases.

iii) le rôle de solubilité : l'élimination des oligosaccharides des glycoprotéines trachéales entraîne leur perte de solubilité dans l'eau (Woodward *et al.*, 1987).

iv) le masquage d'épitopes immunogènes : dans le cas de la hGM-CSF (human granulocyte macrophage-colony stimulating factor), un *O*-glycane masque un épitope situé sur la protéine. Le produit recombinant exprimé chez *E. Coli* et chez la levure (donc non glycosylé) est antigénique alors que l'hormone naturelle ne l'est pas (Gribben *et al.*, 1990).

Dans ce chapitre, beaucoup d'autres propriétés physico-chimiques des glycanes pourraient être citées, comme leur rôle dans la maturation, la sécrétion et le transport des protéines, l'initiation du repliement correct du polypeptide dans le reticulum endoplasmique rugueux.

### ***2.3.1.2. Modulation de l'activité biologique***

Les gonadotrophines (luteinizing hormone (LH), follicle-stimulating hormone (FSH), chorionic gonadotrophin (CG)) et la thyroid-stimulating hormone (TSH) sont des hormones glycoprotéiniques impliquées dans les fonctions de reproduction chez les mammifères et dans la régulation métabolique. Ces quatre hormones sont des hétérodimères constitués d'une sous-unité  $\alpha$  liée de façon non covalente à une sous-unité  $\beta$ . Des études structurales (Kawano *et al.*, 1988) ont montré que la séquence en acides aminés de la sous-unité  $\alpha$  des quatre hormones est identique chez une même espèce mais que la glycosylation

**Tableau 5** : Structure des déterminants de groupe sanguin.

Groupe sanguin	Antigène présent	Structure des déterminants
A, AB	A	GalNAc $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)[Fuc $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2)]Gal $\beta$ -(1 $\rightarrow$
B, AB	B	Gal $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)[Fuc $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2)]Gal $\beta$ -(1 $\rightarrow$
O, A, B, AB	H	[Fuc $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2)]Gal $\beta$ -(1 $\rightarrow$

est différente. Dans les urines d'une femme enceinte ont été isolées l'hCG (human chorionic gonadotrophin) ainsi que des sous-unités  $\alpha$  libres. En dépit d'une séquence en acides aminés strictement identique à celle décrite pour les autres sous-unités  $\alpha$ , ces sous-unités  $\alpha$  libres sont incapables de s'associer à des sous-unités  $\beta$  afin de former l'hCG. Les études structurales effectuées sur ces dernières (Kawano *et al.*, 1988) ont révélé qu'elles ne renfermaient qu'un seul glycanne au lieu des deux habituellement rencontrés. Ainsi, cette différence de glycosylation des sous-unités  $\alpha$  libres leur interdit toute association avec des sous-unités  $\beta$ .

Signalons enfin que l'élimination des glycanes de l'hCG permet une meilleure fixation de l'hormone à son récepteur mais entraîne une perte totale de son activité biologique.

#### ***2.3.1.3. Propriétés immunologiques***

Certains oligosaccharides présents à la surface d'une cellule ou d'une molécule définissent des épitopes immunogènes. Le cas le mieux illustré est sans aucun doute celui du système de groupe sanguin ABO. En effet, les quatre groupes sanguins O, A, B et AB reposent sur la structure de certains oligosaccharides présents à la surface des cellules, en particulier les globules rouges à partir desquels est communément effectué le sérotypage des individus. Le tableau 5 présente la structure des oligosaccharides correspondant à chacun de ces groupes.

#### ***2.3.1.4. Rôle dans les phénomènes de reconnaissance***

i) la reconnaissance cellule-cellule : la présence de très nombreuses chaînes oligosaccharidiques à la surface de toutes les cellules indique qu'elles doivent participer pour une grande part dans les phénomènes de reconnaissance et d'interaction entre cellules.

A titre d'exemple, on peut citer celui des sélectines (L, E et P) qui sont des protéines membranaires rencontrées respectivement dans les leucocytes, l'endothélium de tissu subissant une réaction inflammatoire et les plaquettes. Elles participent à l'extravasation des neutrophiles en réponse à l'inflammation. Ces phénomènes impliquent la mise en place de signaux de reconnaissance spécifiques entre les différentes cellules. Dans les trois cas, ces signaux sont représentés par des séquences oligosaccharidiques particulières présentes à la surface des cellules. Plusieurs de ces séquences ont été caractérisées, comme celles de type sialyl Le<sup>x</sup> ou encore sialyl Le<sup>a</sup> (tableau 3, page 24).

Un autre bel exemple d'interaction cellule-cellule est celui de la reconnaissance spécifique des ovules d'une espèce par les spermatozoïdes de la même espèce lors de la fécondation et qui implique également des chaînes oligosaccharidiques (Bleil et Wassarman, 1988).

Concernant ces phénomènes de reconnaissance, voir la revue générale de Crocker et Feizi (1996).

ii) le contrôle de la durée de demi-vie des glycoprotéines : l'une des fonctions des glycanes des glycoprotéines serait de contrôler leur durée de demi-vie. En effet, lorsqu'on retire les acides sialiques d'une glycoprotéine, on observe son élimination de la circulation sanguine en quelques minutes. La présence de galactose en position terminale d'un glycanne entraîne une reconnaissance spécifique de ce dernier par des lectines membranaires présentes à la surface de cellules hépatiques. Une fois fixée sur la lectine, la glycoprotéine est internalisée et détruite au niveau des lysosomes. D'autres lectines membranaires ont été décrites comme celles présentes à la surface de cellules réticuloendothéliales ou de macrophages qui reconnaissent les résidus de mannose et de *N*-acétylglucosamine en

position terminale d'un glycanne (Mc Farlane, 1983 ; Sharon et Lis, 1989 ; Ashwell et Arford, 1992).

iii) le rôle dans l'adressage cellulaire : le meilleur exemple de cette fonction est fourni par les résidus de mannose-6-phosphate présents dans les enzymes lysosomiales nouvellement synthétisées. Ces derniers dirigeront spécifiquement ces enzymes vers le lysosome où elles seront internalisées (Dahms *et al.*, 1989).

Bien entendu, cette présentation n'est pas exhaustive et de plus amples renseignements ainsi que de nombreux autres exemples pourront être obtenus en se reportant aux revues générales des auteurs suivants : Cumming (1991) ; Kobata (1992) ; Varki (1993) ; Lis et Sharon (1993).

Les glycanes aident à générer la diversité fonctionnelle exigée par l'évolution et le développement des différents types de cellules, tissus, organes et espèces. En effet, le nombre de gènes disponibles dans le génôme pour former une telle diversité étant insuffisant, la nature a contourné la difficulté en développant un mécanisme très subtil basé sur la glycosylation des glycoprotéines et capable d'apporter la diversité et la grande variété de fonctions nécessaires à la vie.

### **2.3.2. Etude des relations structure-fonction de l'érythropoïétine humaine**

Pour mesurer l'importance d'un glycanne sur le plan biologique, l'une des meilleures techniques consiste à remplacer par mutation génétique un résidu d'asparagine ou de sérine porteur d'un glycanne par un autre acide aminé et à étudier le comportement de la glycoprotéine mutée. Cette approche expérimentale a permis de préciser le rôle des

glycannes des différents sites de glycosylation sur la sécrétion et l'activité biologique de l'érythropoïétine. Ainsi, des mutations ponctuelles, visant à altérer un seul des trois sites de glycosylation de l'érythropoïétine (Asn-24, Asn-38 et Asn-83) ou plusieurs à la fois, ont été entreprises essentiellement par Dubé *et al.* en 1988 et Delorme *et al.* en 1992.

### **2.3.2.1. Rôle des glycannes dans la sécrétion de l'érythropoïétine**

Les résultats obtenus par ces auteurs sont les suivants :

- i) l'élimination, par mutagenèse dirigée, des trois sites de *N*-glycosylation entraîne une inhibition de sa sécrétion;
- ii) l'absence simultanée des glycannes sur les sites de glycosylation Asn-38 et Asn-83 a le même effet que précédemment (aucune sécrétion). Toutefois, la présence de glycannes sur l'un de ces 2 sites permet de rétablir une sécrétion normale de l'érythropoïétine;
- iii) quant aux glycannes du site Asn-24, ils ne semblent pas influencer la sécrétion de l'érythropoïétine puisque celle-ci n'est pas modifiée en leur absence. De plus, dans le cas où ce site constitue l'unique site de *N*-glycosylation de l'érythropoïétine (altération des sites Asn-38 et -83), la sécrétion est inhibée.

Il apparaît donc, grâce à ces expériences de mutations dirigées, que les *N*-glycannes des sites Asn-38 ou Asn-83 (tous deux de type complexe et majoritairement tétraantennés), jouent un rôle crucial dans la sécrétion de l'érythropoïétine.

Enfin, les mêmes auteurs ont effectué une mutation sur la sérine en position 126 (site de *O*-glycosylation) pour connaître l'influence des *O*-glycannes sur la sécrétion de l'érythropoïétine. Leur conclusion diverge quelque peu dans le sens où, pour le premier, l'altération du site Ser-126 entraîne à la fois une diminution de la sécrétion et du temps de

demi-vie de l'érythropoïétine, alors que pour le second, aucune incidence n'a été observée sur ces deux paramètres.

### **2.3.2.2. Rôles des glycanes dans l'activité biologique**

L'absence de *N*-glycanes entraîne, *in vivo*, une perte totale d'activité biologique de l'érythropoïétine, alors qu'*in vitro*, une activité biologique bien supérieure à celle de l'érythropoïétine native est observée (Dordal *et al.*, 1985 ; Tsuda *et al.*, 1990). Toutefois, concernant l'activité biologique *in vitro* d'érythropoïétine déglycosylée, des résultats contradictoires ont été obtenus. En effet, Takeuchi *et al.* en 1990 révèlent une perte totale d'activité biologique que ce soit *in vivo* ou *in vitro*. De même, Dubé *et al.* en 1988 montrent une perte d'activité biologique de 75% lorsque le site Asn-24 est muté, de 80% s'il s'agit du site Asn-38 et de 100% s'il s'agit du site Asn-83.

Enfin, signalons qu'en absence de glycanes, l'érythropoïétine a tendance à former des agrégats (Delorme *et al.*, 1992).

Des mesures de temps de demi-vie plasmatique ont permis d'expliquer la perte d'activité biologique observée *in vivo*, en révélant que les glycoprotéines déglycosylées sont très rapidement éliminées de la circulation sanguine (Weber *et al.*, 1985 ; Gross *et al.*, 1987).

L'ensemble de ces travaux conduit les auteurs à penser que les glycanes ne seraient pas impliqués directement dans l'interaction de l'érythropoïétine avec son récepteur, mais qu'ils joueraient un rôle important dans le temps de demi-vie de la molécule. D'autres rôles ont été attribués aux glycanes comme le maintien de la molécule dans une conformation biologiquement active ou encore la solubilité du squelette protéique qui, rappelons le, renferme beaucoup d'acides aminés hydrophobes (Nahri *et al.*, 1991).



Si, *in vivo*, la présence des *N*-glycannes apparaît cruciale dans l'activité biologique de l'érythropoïétine, le degré d'antennarisation (2, 3 ou 4 antennes par molécule) l'est également. En effet, Takeuchi *et al.* (1989) ont isolé deux types d'érythropoïétine : l'une riche en structure de type biantennée (nommée epo-bi) et l'autre riche en structure de type tétraantennée (nommée epo-tétra). Pour chacun des types, ils ont étudié, *in vivo* et *in vitro*, l'activité biologique qu'ils ont comparée à celle de l'érythropoïétine normale appelée epo-standard. L'epo-bi présente, *in vivo*, une activité biologique 7 fois inférieure à l'epo-standard et *in vitro* 3 fois supérieure. Par contre, une activité biologique comparable à celle de l'epo-standard, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, a été constatée pour l'epo-tétra. La baisse *in vivo* de l'activité biologique de l'epo-bi ne peut être expliquée par un défaut d'activation de la réponse biologique au niveau du récepteur puisque l'activité *in vitro* est plus élevée.

Ces résultats montrent donc qu'un degré d'antennarisation élevé des *N*-glycannes est également important pour l'activité biologique *in vivo* de l'érythropoïétine. Certains auteurs (Takeuchi *et al.*, 1990 ; Wasley *et al.*, 1991) pensent que les antennes polyN-acétyllactosaminiques pourraient constituer des déterminants spécifiques dans le ciblage *in vivo* de l'érythropoïétine vers les cellules cibles.

### **2.3.2.3. Rôle des acides sialiques**

L'érythropoïétine injectée à des rats est lentement éliminée de la circulation sanguine avec un temps de demi-vie compris entre 2 et 3 heures. Par contre, l'asialoérythropoïétine obtenue après traitement de l'érythropoïétine par des sialidases, est rapidement éliminée de la circulation (temps de demi-vie = 2 à 10 minutes) (Fukuda *et al.*, 1989 ; Spivak et Hogans, 1989) et aucune activité biologique ne peut être détectée (Imai *et al.*, 1990b ; Higuchi *et al.*, 1992). Cela signifie donc qu'*in vivo*, l'activité biologique de l'érythropoïétine est dépendante de son état de sialylation, comme l'atteste la relation linéaire qui existe entre le

logarithme de l'activité spécifique de l'érythropoïétine et le nombre d'acides sialiques présents par molécule (Imai *et al.*, 1990b ; Higuchi *et al.*, 1992). *In vivo*, l'élimination très rapide de l'asialoérythropoïétine hors de la circulation sanguine est due à la présence, dans le foie, de cellules présentant à leur surface des lectines spécifiques du galactose (encore appelées récepteurs d'Ashwell) (Ashwell et Harford, 1992). La fixation sur ces récepteurs de molécules d'érythropoïétine désialylée entraîne leur internalisation dans la cellule et leur destruction ultérieure dans les lysosomes.

A l'inverse de ce qui est observé *in vivo*, l'érythropoïétine désialylée présente *in vitro* une activité biologique environ 3 fois supérieure à celle de l'epo-standard (Takeuchi *et al.*, 1990). Tsuda *et al.* (1990) et Imai *et al.* en 1990 (b) ont montré que l'asialoérythropoïétine est plus affine pour le récepteur de l'érythropoïétine que l'érythropoïétine sialylée. Cela serait dû à l'inversion de polarité de la charge globale des molécules : sous forme sialylée, l'érythropoïétine possède une charge globale négative (due aux groupements carboxyliques des acides sialiques) alors que sous sa forme désialylée, elle possède une charge globale positive.

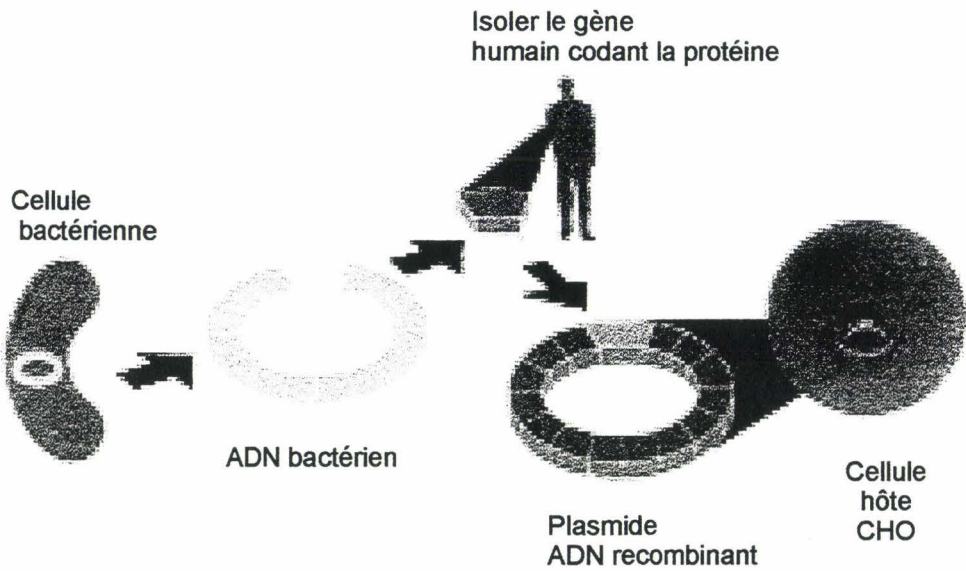
En conclusion, les acides sialiques jouent un rôle important dans la durée de demi-vie plasmatique de l'érythropoïétine en masquant les résidus de galactose en position terminale, retardant ainsi son élimination.

### **3. Les érythropoïétines humaines recombinantes**

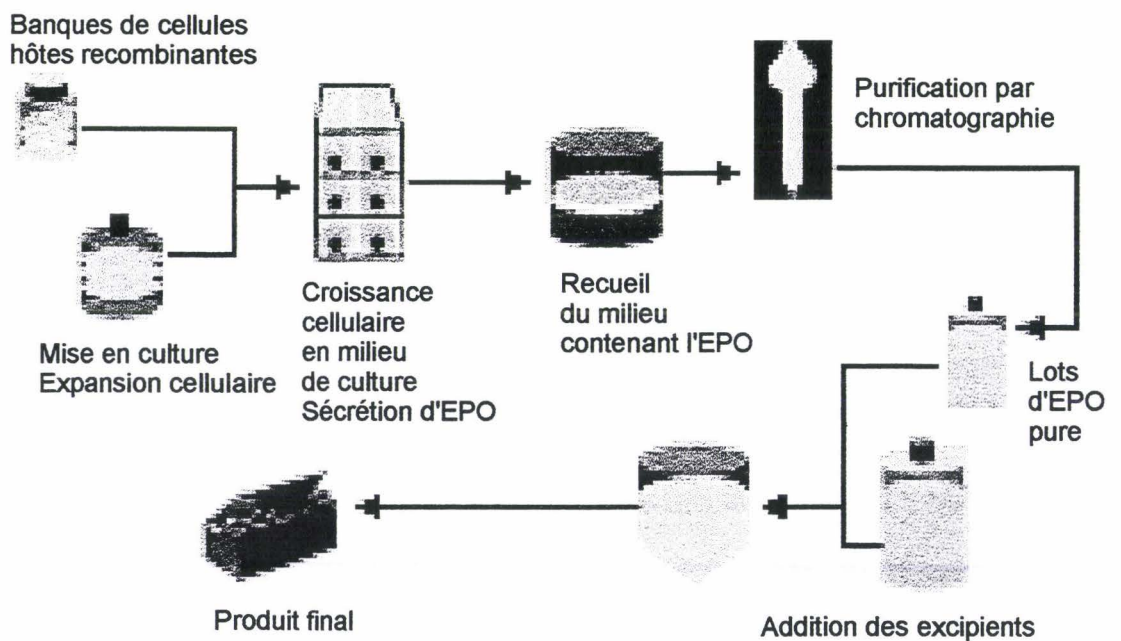
#### **3.1. Généralités sur la production de l'érythropoïétine humaine**

##### ***recombinante***

Afin d'illustrer les différentes étapes de la production d'une érythropoïétine humaine recombinante, nous prendrons comme exemple celle produite par la société Amgen aux



**Figure 15a :** Schéma de la transfection d'un gène humain dans une cellule hôte.



**Figure 15b :** Schéma de production de l'érythropoïétine humaine recombinante commercialisée sous le nom d'Eprex (Poisson, 1995).

USA et commercialisée sous le nom d'eprex ou encore époétine  $\alpha$  (Poisson, 1995 ; Inoue *et al.*, 1995) (Fig. 15a et 15b).

La première étape a consisté à créer une banque principale de cellules (master cell bank). Après avoir isolé le gène humain codant l'érythropoïétine humaine, celui-ci a été inséré dans un ADN bactérien en présence d'un promoteur fort (comme le SV40) pour former un plasmide. Ce dernier a été ensuite introduit par transfection dans une cellule hôte qui est, dans le cas de l'eprex, une cellule ovarienne de hamster chinois (cellule CHO). Ces cellules ainsi transfectées possèdent désormais la propriété de produire de l'érythropoïétine humaine recombinante et vont constituer la banque principale de cellules.

De cette banque principale vont dériver les banques de cellules de travail à partir desquelles sera produite l'érythropoïétine. La première étape vise à assurer la multiplication des cellules de la banque de travail (expansion cellulaire) grâce à trois cultures successives. La seconde étape consiste à effectuer une culture cellulaire monocouche au cours de laquelle l'érythropoïétine humaine recombinante sera produite et recueillie. La troisième étape a pour but de la purifier. Pour cela, trois techniques différentes de chromatographies sont mises en oeuvre (chromatographies d'échange d'anions, de phase inversée et de tamisage moléculaire). Après une dernière étape de diafiltration, l'érythropoïétine recombinante humaine est associée à la sérumalbumine (utilisée comme agent de stabilisation). L'eprex ainsi produite peut alors être conditionnée et commercialisée.

De nombreux contrôles de qualité sont réalisés tout au long de cette production. Outre les contrôles effectués sur les cellules pour vérifier la stabilité du système vecteur-hôte et l'absence de contamination microbienne (virale, bactérienne ou fongique), de nombreux autres contrôles sont effectués sur l'érythropoïétine de façon à s'assurer d'une part, de l'identité, de la pureté et de l'activité de l'érythropoïétine par rapport à une

molécule d'érythropoïétine de référence, et d'autre part de la reproductibilité de production d'un lot à l'autre.

### **3.2. Les différents systèmes d'expression**

Deux facteurs semblent jouer un rôle essentiel dans la structure des glycanes d'une glycoprotéine recombinante :

- i) l'équipement enzymatique de glycosylation de la cellule hôte
- ii) la structure peptidique (primaire, secondaire et tertiaire) de la glycoprotéine (Elliott *et al.*, 1994).

La cellule hôte détermine la structure de la partie terminale alors que la partie protéique de la glycoprotéine détermine le type du *N*-glycane (Takeuchi et Kobata, 1991). Il paraît donc important de bien choisir la cellule hôte afin de produire une glycoprotéine recombinante possédant une structure glycanique la plus proche de la naturelle.

L'érythropoïétine recombinante a été exprimée dans différents systèmes cellulaires (CHO, BHK, HeLa, Namalwa et tabac). Nous allons examiner la glycosylation de chacune des érythropoïétines produites dans ces différentes cellules.

#### **3.2.1. Production par des cellules CHO**

A ce jour, les cellules CHO ont été les plus utilisées pour la production de glycoprotéines recombinantes à visée thérapeutique. Parmi les principales, citons les interférons  $\beta$  et  $\gamma$ , le G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor), le t-PA (tissue plasminogen activator), le TGF  $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ), les antithrombines I et II, l'interleukine IL-2, le TNF (tissue necrosis factor), l'érythropoïétine humaine. Ces cellules présentent deux avantages : un rendement de production élevé et un équipement enzymatique de glycosylation qui permet une synthèse de glycanes dont la structure est proche de celle rencontrée dans la glycoprotéine naturelle (Takeuchi et Kobata, 1991).

**Tableau 6 :** Structure des *N*-glycannes désialylés de l'érythropoïétine humaine recombinante produite dans les cellules CHO.

	Sasaki <i>et al.</i> (1987)	Sasaki <i>et al.</i> (1988)	Takeuchi <i>et al.</i> (1988)	Rice <i>et al.</i> (1992)	Rush <i>et al.</i> (1993)	Linsley <i>et al.</i> (1994)	Watson <i>et al.</i> (1994)	Hokke <i>et al.</i> (1995)	Rush <i>et al.</i> (1995)
	1,4	2	6	5,5±0,3	6,9	8,8	7	9	+
	—	—	—	—	—	—	—	<1	—
	10	8,7	—	9,8±0,6	9,3	15,5	11	18	+
	3,5	—	13,4	—	—	1,3	—	6	—
	—	—	—	—	—	—	—	2	—
	31,8	59,7	46	66,6±0,6	32,7	45,6	++++	37	+
	32,1	22	30,2	14,7±1,2	20,6	22	+++	16	+
	16,5	5,7	4,3	3,1±1,3	14,7	5,4	++	10	+
	4,7	1,7	—	—	6,3	+	+	—	+

En utilisant ces cellules, les glycanes de l'érythropoïétine humaine recombinante obtenue ressemblent fortement à ceux de l'érythropoïétine urinaire (Davis *et al.*, 1987 ; Watson *et al.*, 1994 ). Le taux de glycosylation est voisin de 40%, les *N*-glycanes sont de type complexe et les *O*-glycanes de type mucine.

Le tableau 6 présente, sous la forme désialylée, les différentes structures *N*-glycanniques décrites pour les érythropoïétines recombinantes produites par les cellules CHO.

Alors que la proportion de glycanes de type tétraantenné est très élevée dans les sites de glycosylation Asn-38 et Asn-83, le site de glycosylation Asn-24 fait apparaître davantage de structures de type bi- et triantenné. Toutefois, comparée à l'érythropoïétine humaine urinaire, on constate, que le taux de glycanes possédant au moins une répétition *N*-acétyllactosaminique est plus élevé. C'est ainsi que certains glycanes tétraantennés possèdent jusqu'à trois répétitions *N*-acétyllactosaminiques et que des structures triantennées en possèdent une, voire deux (voir tableau 6). De telles structures n'ont pas été décrites dans l'érythropoïétine humaine urinaire.

Comme pour cette dernière, les *N*-glycanes sont fortement fucosylés (>90%) et sialylés (80 à 97%). Toutefois, concernant le taux de sialylation, il existe selon les auteurs des divergences. Ainsi, Rice *et al.* (1992) et Watson *et al.* (1994) affirment que plus de 95% des oligosaccharides sont totalement sialylés alors que Sasaki *et al.* (1987) affirment qu'au moins un résidu de galactose terminal par glycanne n'est pas sialylé. Selon Warner *et al.* (1993), ces différences de sialylation seraient liées à l'utilisation de clones cellulaires différents mais aussi à des conditions de culture légèrement différentes qui influeraient sur l'activité de la  $\beta$ Gal: $\alpha$ 2-3sialyltransférase. De plus, ces auteurs ont isolé du milieu de culture une neuraminidase soluble.

Quoiqu'il en soit, tous les acides sialiques de l'érythropoïétine humaine recombinante sont liés au galactose terminal par une liaison  $\alpha$ -(2→3) car les cellules CHO ne possèdent pas l'enzyme (la CMP-NeuAc:Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\alpha$ 2-6 sialyltransférase) qui permet de lier un acide sialique en  $\alpha$ -(2→6) sur un résidu de galactose (Takeuchi *et al.*, 1988). Rappelons que dans l'érythropoïétine humaine urinaire, les 2 types de liaisons sialyles ( $\alpha$ -(2→3) et  $\alpha$ -(2→6)) ont été décrites.

Enfin, ces acides sialiques sont représentés majoritairement par l'acide *N*-acétylneuraminique mais aussi par de l'acide 9-*O*-acétyl-*N*-acétyl neuraminique (Rush *et al.*, 1995; Hokke *et al.*, 1995) et jusqu'à 3% d'acide *N*-glycolylneuraminique (Linsley *et al.*, 1994 ; Hokke *et al.*, 1990, 1995; Rush *et al.*, 1995). Ce dernier acide sialique est absent chez l'homme, sauf dans le cas de cancers, et sa présence peut entraîner une réaction immunologique se traduisant par la production d'anticorps appelés Hanganutziu-Deicher (AD) (Noguchi *et al.*, 1995). Toutefois, une telle réaction immunologique dirigée contre l'acide *N*-glycolylneuraminique de molécules d'érythropoïétine humaine recombinante n'a pu être démontrée chez l'homme (Noguchi *et al.*, 1996).

Quant aux *O*-glycannes présents sur la sérine en position 126, ils sont identiques à ceux de l'érythropoïétine humaine urinaire.

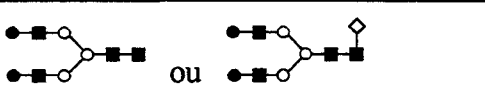
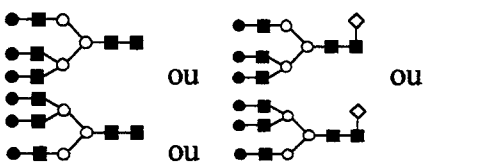
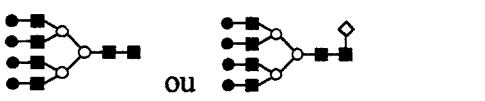
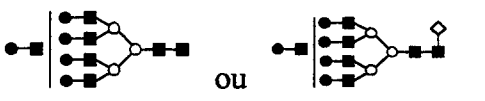
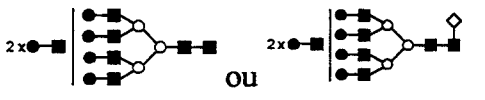
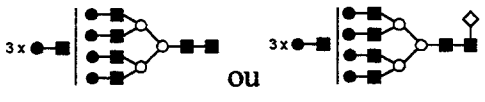
### 3.2.2. Production par des cellules BHK

Des essais de production d'érythropoïétine recombinante ont été réalisés en utilisant des cellules BHK (Baby Hamster Kidney).

Le tableau 7 présente, sous la forme désialylée, les différentes structures glycaniques retrouvées dans ces érythropoïétines recombinantes. On note que la majorité des *N*-glycannes sont tétraantennés avec la présence ou non de répétition *N*-acétyllactosaminique (Tsuda *et al.*, 1988 ; Nimitz *et al.*, 1993). Ces glycannes sont surtout



**Tableau 7 :** Structure des *N*-glycannes désialylés de l'érythropoïétine humaine recombinante produite dans les cellules BHK.

	Tsuda <i>et al.</i> (1988)	Nimtz <i>et al.</i> (1993)	Morimoto <i>et al.</i> (1996)
	6,6	4,6	+
	16,5	9,7	+
	51,4	55,9	+
	14,9	22,8	+
	9,2	3,6	+
	1,4	0,4	+

retrouvés au niveau des sites de glycosylation Asn-38 et Asn-83 alors que les quelques glycannes biantennés et triantennés le sont surtout au niveau du site de glycosylation Asn-24. Le premier fait marquant est la présence dans certains glycannes, d'antennes de type iso-*N*-acétyllactosaminiques (galactose lié en  $\beta$ -(1→3) sur la *N*-acétylglucosamine) (Tsuda *et al.*, 1988 ; Takeuchi et Kobata, 1991 ; Nimtz *et al.*, 1993). Or, de telles structures n'ont jamais été décrites dans l'érythropoïétine humaine urinaire. Ainsi, leur présence pourrait générer, chez des sujets non compatibles, une réaction immunologique qui entraînerait une perte totale d'activité biologique après seulement quelques injections.

La majorité des *N*-glycannes est fucosylée sur la *N*-acétylglucosamine du point d'attache (voir tableau 7) et sialylée sur les résidus de galactoses terminaux grâce uniquement à des liaisons  $\alpha$ -(2→3) (Nimtz *et al.*, 1993 ; Morimoto *et al.*, 1996). Enfin, il faut remarquer la présence (comme dans le cas des cellules CHO) d'une faible quantité d'acide *N*-glycolylneuraminique (Nimtz *et al.*, 1993) avec les conséquences possibles que nous avons signalées précédemment.

Le second fait marquant dans la glycosylation de l'érythropoïétine recombinante produite par des cellules BHK concerne le site de *O*-glycosylation qui, pour environ un tiers des molécules, n'est pas glycosylé (Nimtz *et al.*, 1993). Les structures *O*-glycanniques présentes sur le reste des molécules sont identiques à celles décrites pour l'érythropoïétine humaine urinaire.

### 3.2.3. Production par des cellules HeLa

Dans le but de produire une érythropoïétine humaine recombinante dont la structure des chaînes glycanniques seraient identique à celle de l'érythropoïétine humaine urinaire, Ohashi *et al.* en 1989 et Takeuchi et Kobata en 1991 ont pensé que l'utilisation d'une lignée

cellulaire humaine (cellules HeLa) plutôt qu'une lignée cellulaire murine (CHO ou BHK) permettrait d'y arriver.

Malheureusement, si les chaînes glycaniques de l'érythropoïétine recombinante produite par ces cellules ressemblent très fortement à celles de l'érythropoïétine humaine urinaire, aucune d'elles ne possède de répétition *N*-acétyllactosaminique qui, comme nous l'avons signalé précédemment, constitue une caractéristique structurale des glycanes de l'érythropoïétine. Aucune information concernant la sialylation des glycanes n'a été précisée car toutes les études structurales ont été faites après désialylation des molécules.

#### **3.2.4. Production par des cellules Namalwa**

Dans un même but, de l'érythropoïétine humaine recombinante a été produite par des cellules lymphoblastoïdes B humaines appelées cellules Namalwa (Yanagi *et al.*, 1989).

Les deux glycanes majeurs correspondent à une structure tétraantennée fucosylée et à une structure triantennée fucosylée, mais comme pour l'utilisation de cellules HeLa, aucun glycanne ne porte de répétition *N*-acétyllactosaminique. Comme précédemment, l'étude de la structure des glycanes a été faite après désialylation.

#### **3.2.5. Production par des cellules de tabac**

Il est possible de produire des protéines de mammifères en utilisant des cellules végétales. Le système végétal présente deux avantages : le premier réside dans la facilité à pouvoir disposer d'une biomasse végétale importante et le second concerne le rendement de production qui est élevé pour un coût moindre.

En dépit de ces deux avantages, l'utilisation de cellules de tabac pour la production d'une érythropoïétine recombinante a fait apparaître trois inconvénients majeurs (Matsumoto *et al.*, 1995). Premièrement, l'érythropoïétine produite par ces cellules reste attachée à la paroi cellulaire et n'est pas libérée dans le milieu de culture. Deuxièmement,

après extraction et purification de l'érythropoïétine recombinante, les *N*-glycannes obtenus se sont révélés être de type oligomannosidique (et non pas de type complexe comme ceux décrits pour l'érythropoïétine humaine urinaire). Enfin, aucune activité biologique *in vivo* n'a pu être détectée ce qui confirme, une nouvelle fois, l'importance de la glycosylation sur l'activité biologique de ces molécules.

## 4. Pathologies liés à l'érythropoïétine et à son récepteur

### 4.1. Les anémies

L'anémie correspond à une diminution de la quantité d'hémoglobine par unité de volume de sang.

Dans la majorité des anémies, lorsque la fonction rénale est normale, le taux d'érythropoïétine sérique augmente de façon inversement proportionnelle au taux d'hémoglobine. Dans ce cas, il est évident qu'il n'existe aucun traitement substitutif par l'érythropoïétine (Casadevall, 1995 ; Varet *et al.*, 1988).

Par contre, l'anémie de l'insuffisance rénale est due à une insuffisance de production d'érythropoïétine par le rein, une diminution de la réponse médullaire et un raccourcissement de la durée de vie des globules rouges. La sécrétion insuffisante d'érythropoïétine semble être le principal facteur impliqué dans l'apparition de cette anémie (Jelkmann, 1994). En effet, la simple réduction de la masse du rein et du nombre de cellules synthétisant l'érythropoïétine peut expliquer à elle seule le développement d'une anémie (Erslev et Besarab, 1997). Si l'anémie n'est pas traitée, elle peut éventuellement devenir suffisamment sévère pour causer une insuffisance cardiaque et exiger une transfusion sanguine (Erslev et Besarab, 1997).

Au cours de certaines anémies à fonction rénale conservée, il peut exister des insuffisances relatives de production d'érythropoïétine. C'est le cas dans l'anémie inflammatoire de la

polyarthrite rhumatoïde ou dans certaines anémies liées au cancer. Dans les anémies du cancer, une fois éliminées les causes fréquentes d'anémies telles que les carences martiales, en folates, les hémolyses ou encore les métastases médullaires, on évoque souvent une origine inflammatoire à l'anémie. Chez ces patients, comme dans l'anémie de l'arthrite rhumatoïde et du SIDA, la synthèse endogène d'érythropoïétine est insuffisante et inadaptée au degré de l'anémie (Jelkmann, 1994 ; Casadevall, 1995 ; Moliterno et Spivak, 1996).

Les cytokines, telles le TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ), l'interleukine-1  $\alpha$ ,  $\beta$  et le TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ), produites lors des processus inflammatoires ainsi que d'autres métabolites comme la spermine ou l'hormone parathyroïde, auraient un effet suppresseur sur l'érythropoïétine et sur l'érythropoïèse (Jelkmann, 1994 ; Lacombe et Mayeux, 1995). De plus, dans le cas des thérapies cancéreuses, beaucoup d'agents chimiothérapeutiques ont un effet suppresseur sur les cellules de la moëlle osseuse et en particulier sur l'érythropoïèse (Moliterno et Spivak, 1996), favorisant ainsi l'anémie.

#### **4.2. Les polyglobulies**

A l'inverse de l'anémie, la polyglobulie apparaît quand le nombre de globules rouges augmente anormalement.

Les polyglobulies peuvent être dues à une augmentation de la production d'érythropoïétine. Cette augmentation peut être la conséquence physiologique de l'hypoxie tissulaire dans les polyglobulies de l'altitude, des insuffisances cardiorespiratoires avec désaturation oxygénée du sang artériel et au cours des rares mutations de l'hémoglobine entraînant une augmentation de l'affinité pour l'oxygène (Varet *et al.*, 1988 ; Jelkmann, 1992). Il existe aussi des polyglobulies où l'hypersécrétion de l'érythropoïétine est la conséquence d'une sécrétion non régulée de l'hormone par les cellules d'une tumeur maligne (adénocarcinome du rein, du foie, certains hémangioblastomes et méningiomes) ou bénigne (kyste du rein

principalement) (Varet *et al.*, 1988 ; Youssoufian *et al.*, 1993). Ce syndrome myéloprolifératif pourrait être dû à des anomalies du récepteur ou des protéines impliquées dans la transduction du signal (Youssoufian *et al.*, 1993 ; Barthomeuf *et al.*, 1996a ).

Des anomalies du récepteur (dues à une mutation, une insertion ou une délétion) doivent s'accompagner de désordres de l'érythropoïèse, mais on en connaît encore peu. Toutefois, en Finlande, l'existence d'un récepteur tronqué a été prouvée dans une famille atteinte d'érythrocytose dont l'un des membres, polyglobulique, est champion de ski de fond (Lacombe et Mayeux, 1995 ; Barthomeuf *et al.*, 1996a).

### **4.3. Les érythroleucémies**

Le remplacement de l'arginine 129 par un résidu de cystéine, dans la région extracellulaire du récepteur de l'érythropoïétine, entraîne une activation du récepteur en absence de son ligand. Cette forme activée du récepteur est capable de provoquer des érythroleucémies chez des souris sensibles (Lacombe et Mayeux, 1995). Des réarrangements du gène du récepteur de l'érythropoïétine entraînant sa surexpression ont aussi été mis en évidence dans des lignées érythroleucémiques murines et humaines. Par exemple, une délétion au niveau de l'extrémité 3' du gène du récepteur de l'érythropoïétine conduit à une surexpression de ce récepteur qui apparaît avec une structure normale, induisant une érythroleucémie (Youssoufian *et al.*, 1993). Toutefois, cette surexpression du récepteur n'a pas été retrouvée dans des érythroleucémies *de novo* et son rôle oncogénique reste à établir. Enfin, la prolifération de certaines cellules érythroleucémiques pourrait mettre en jeu un processus autocrine de production d'érythropoïétine (Lacombe et Mayeux, 1995).

## 5. Applications thérapeutiques

### 5.1. Intérêt thérapeutique de l'érythropoïétine humaine recombinante

Après le clonage du gène, l'érythropoïétine humaine recombinante a rapidement été utilisée à des fins thérapeutiques. La production d'érythropoïétine étant essentiellement d'origine rénale, la première indication fut en toute logique le traitement de l'anémie de l'insuffisance rénale chronique terminale et préterminale.

Le marché de l'érythropoïétine est en constante évolution. L'érythropoïétine est actuellement utilisée comme traitement de l'anémie de l'insuffisance rénale chronique (autorisation de mise sur le marché obtenue en 1988), comme traitement adjuvant des prélèvements autologues différés ou des chimiothérapies comportant des sels de platine (autorisation de mise sur le marché obtenue en 1994) (Poisson, 1995 ; Barthomeuf *et al.*, 1996b). L'extension de ces indications dans d'autres circonstances médico-chirurgicales est en cours d'évaluation.

Des informations complémentaires pourront être obtenues en consultant les articles suivants : Rocheman, 1987 ; Varet *et al.*, 1988 ; Foa, 1991 ; Jelkmann, 1992 ; Lacombe et Mayeux, 1995 ; Koch *et al.*, 1995 ; Varet, 1995 ; Casadevall, 1995 ; Barthomeuf *et al.*, 1996a et b ; Moliterno et Spivak, 1996 ; Erslev et Besarab, 1997 ; Goodnough *et al.*, 1997.

#### 5.1.1. Anémie de l'insuffisance rénale

Actuellement, l'érythropoïétine humaine recombinante est prescrite pour corriger l'anémie de l'insuffisance rénale chronique chez l'adulte et l'enfant hémodialysés et chez l'adulte traité par dialyse péritonéale. On l'emploie également chez l'adulte souffrant d'insuffisance rénale chronique et d'anémie avant le stade de la dialyse (Barthomeuf *et al.*, 1996b). L'anémie de la plupart de ces patients est corrigée de façon dose-dépendante dans les trois mois qui suivent l'injection de l'érythropoïétine humaine recombinante. Le

traitement comporte toujours deux phases : la phase de correction de l'anémie avec augmentation dès la deuxième semaine du nombre de réticulocytes sanguins, suivie d'une élévation du taux d'hémoglobine ; et la phase d'entretien qui permet de prévenir la rechute. Une correction trop rapide de l'anémie ne paraît pas souhaitable, car elle favoriserait l'apparition d'une hypertension artérielle ou de convulsions (Varet *et al.*, 1988 ; Casadevall, 1995 ; Erslev et Besarab, 1997). Le schéma thérapeutique et les posologies prennent en compte ces éléments. L'utilisation prolongée de l'érythropoïétine humaine recombinante ne semble pas entraîner une réduction de son efficacité.

L'érythropoïétine est administrée par voie intraveineuse ou sous-cutanée. La voie sous-cutanée est recommandée pour les adultes en pré-dialyse et pour les patients en dialyse péritonéale. En effet, le mode sous-cutané permet de « distribuer lentement » l'érythropoïétine et d'éviter le pic sanguin observé après administration intraveineuse et non nécessaire à son efficacité (Foa, 1991 ; Barthelemy *et al.*, 1996b).

Ce traitement s'avère très efficace car on observe une correction de l'anémie, une élévation du taux d'hémoglobine, de l'hématocrite et une augmentation du nombre de réticulocytes dans la majorité des cas. Dans quelques rares cas, il a été observé une production d'anticorps anti-érythropoïétine recombinante qui rendent le traitement inefficace (Bergrem *et al.*, 1993 ; Garcia *et al.*, 1993 ; Casadevall *et al.*, 1996 ; Peces *et al.*, 1996).

En cas de carence martiale (carence en fer), l'instauration d'une supplémentation en fer s'impose.

L'administration de l'érythropoïétine humaine recombinante au patient dialysé permet d'éviter les transfusions sanguines. Ainsi, en limitant les besoins transfusionnels, ce traitement limite l'hyperimmunisation HLA qui constitue un handicap important pour les patients candidats à la transplantation rénale puisqu'il allonge la durée d'attente du greffon ;



il permet de plus d'éviter les risques de réactions d'incompatibilité, d'alloimmunisation, d'infection virale et les surcharges en fer.

L'hormone recombinante, en corrigeant l'anémie, améliore les grandes fonctions physiologiques, notamment celles impliquant l'appareil cardiovasculaire, le système immunitaire, le système endocrine, l'état nutritionnel et l'hémostase. Des études ont montré que la correction de l'anémie s'accompagnait d'une amélioration de la qualité de vie, de l'état de stress, d'une diminution du nombre de patients dépressifs ou s'autodépréciant, d'une moindre fatigue et d'une réduction des troubles du sommeil. L'état nutritionnel est meilleur. On observe une amélioration des performances psychiques, intellectuelles, sexuelles et physiques (Foa, 1991 ; Barthomeuf *et al.*, 1996a ; Erslev et Besarab, 1997). Sur le plan physique, la tolérance à l'effort est accrue et la récupération plus rapide.

L'anémie chronique induit une baisse de la viscosité sanguine et une hypoxie tissulaire ce qui nécessite une adaptation myocardique, entraînant notamment un accroissement de la demande en oxygène du myocarde. Tout ceci contribue au développement d'une cardiomégalie et d'une hypertrophie ventriculaire gauche. L'administration de l'érythropoïétine humaine recombinante permet d'améliorer le transport en oxygène et les anomalies cardiovasculaires structurales et fonctionnelles induites par cette anémie. La fréquence des anomalies de la circulation sanguine, observée chez les hémodialysés, décroît lorsqu'un traitement parallèle à l'érythropoïétine humaine recombinante est suivi.

Le traitement à l'érythropoïétine recombinante s'accompagne également d'une normalisation des fonctions immunitaires altérées par l'insuffisance rénale.

Cependant, l'administration d'érythropoïétine recombinante n'est pas sans effets indésirables. Des douleurs au site d'injection ont été signalées lors de l'administration sous-cutanée notamment pour de fortes posologies. Mais le risque majeur reste l'hypertension artérielle qui survient chez 20 à 30% des patients dans les semaines qui suivent

l'administration de l'hormone. L'augmentation de la viscosité sanguine et une vasoréactivité anormale pourraient être impliquées. L'hypertension est le plus souvent bien contrôlée par un réajustement des conditions de dialyse et par l'adjonction d'un traitement hypotenseur.

Des crises convulsives, le plus souvent généralisées, peuvent parfois survenir au cours des traitements. Elles se produisent essentiellement dans les trois premiers mois du traitement et seraient favorisées par une correction trop rapide de l'anémie. Elles surviendraient plus volontiers chez les patients ayant des antécédents d'épilepsies.

### **5.1.2. Anémie associée aux cancers**

Une anémie est fréquemment retrouvée chez les patients cancéreux avant même qu'une chimiothérapie cytotoxique ne soit appliquée. En absence d'hémorragie ou d'hémolyse, cette anémie est souvent la conséquence d'une production d'érythropoïétine affaiblie et l'incapacité des progéniteurs cellulaires érythroïdes à répondre à l'érythropoïétine endogène. Cette déficience est probablement due à une production de cytokines inflammatoires (comme le tumor necrosis factor ou l'interleukine-1) par ces patients (Moliterno et Spivak, 1996 ; Foa, 1991).

En dépit d'un taux basal d'érythropoïétine endogène élevé, l'administration d'érythropoïétine exogène augmente de façon significative le taux d'hémoglobine, l'hématocrite et le nombre de réticulocytes chez la plupart des patients cancéreux.

Dans le cas des chimiothérapies, les sels de platine sont des agents anticancéreux souvent prescrits pour traiter les tumeurs solides tels que les cancers cervicaux, testiculaires, ovariens, pulmonaires et les mélanomes malins. Leur toxicité hématopoïétique prononcée expose fréquemment à la survenue ou à l'aggravation d'une anémie dont la sévérité dépend de la dose de sels de platine administrée. L'intensité de cette anémie nécessite souvent des transfusions.

L'administration de l'érythropoïétine recombinante permet d'augmenter chez la plupart de ces patients le taux d'hémoglobine de façon dose-dépendante. Elle améliore la qualité de vie et réduit les besoins transfusionnels. Le traitement ne provoque pas d'effets secondaires indésirables autres que ceux habituellement liés à l'utilisation de cette molécule. Il ne favorise pas la croissance des cellules tumorales ou leucémiques et ne modifie pas la chimiosensibilité.

### **5.1.3. Prélèvement sanguin autologue différé**

Le prélèvement autologue différé consiste à recueillir du sang chez un patient et à lui restituer ultérieurement tout ou partie de ses composants sanguins. Il vise à prévenir les risques immunologiques ou infectieux inhérents aux transfusions homologues. Ce type de prélèvement est principalement utilisé en chirurgie cardiaque et orthopédique pour des opérations programmées et nécessitant des volumes sanguins importants.

L'érythropoïétine humaine recombinante permet d'accroître la fréquence et le volume des recueils, donc de réduire la période de prélèvement préopératoire. Lors de l'intervention, le taux de l'hématocrite est plus élevé chez les patients ayant reçu de l'érythropoïétine humaine recombinante et ce, bien que les volumes de sang préalablement recueillis soient plus importants que chez les patients non traités.

### **5.1.4. Autres indications**

L'anémie compliquant les états inflammatoires chroniques, les cancers et le SIDA traité par l'AZT (zidovudine) est parfois associée à une production insuffisante d'érythropoïétine. Des cytokines comme le tumor necrosis factor  $\alpha$  et l'interleukine-1, par l'intermédiaire de l'interféron  $\gamma$ , seraient à l'origine de cette anomalie de production et exerceraient un effet suppresseur sur l'érythropoïèse médullaire.

L'érythropoïétine recombinante permet de traiter l'anémie des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde. Malheureusement, la correction de l'anémie n'est pas associée à une amélioration de la qualité de vie.

L'anémie des patients atteints de syndrome myélodysplasique est principalement liée à la dépression de l'hématopoïèse. L'érythropoïétine seule étant peu efficace dans cette anémie, l'association d'érythropoïétine recombinante et de G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor) permet d'obtenir des résultats beaucoup plus significatifs.

Quant aux patients sidéens, ils développent fréquemment une anémie symptomatique liée au traitement par l'AZT ou à un effet direct du virus sur les progéniteurs médullaires et sur la durée de vie des globules rouges. Un traitement avec l'érythropoïétine recombinante permet de corriger leur anémie et d'améliorer leur qualité de vie.

Pour terminer, l'érythropoïétine recombinante peut également être prescrite sans danger dans l'anémie de la femme enceinte puisqu'elle ne passe pas la barrière placentaire.

## **5.2. Autres applications**

L'érythropoïétine recombinante peut être utilisée à des fins illicites. Durant les dix dernières années, un certain nombre d'athlètes pratiquant des sports d'endurance se sont laissés tenter par les avantages de l'hormone et ont préféré la prise de l'érythropoïétine humaine recombinante à un entraînement en altitude.

Dans la pratique sportive, il est bien connu qu'un exercice de longue durée, un marathon ou le ski de fond par exemple, est en relation directe avec l'aptitude maximale à consommer de l'oxygène ( $VO_2\text{max}$ ). Ce débit d'oxygène mis à la disposition des tissus dépend ainsi à la fois des valeurs maximales du débit cardiaque et de la différence artérioveineuse des gaz du sang (concentration de l'oxygène dans le sang artériel ( $CaO_2$ ) - concentration de l'oxygène dans le sang veineux ( $CvO_2$ )). Or,  $VO_2\text{max}$  diminue quand la concentration de l'oxygène

dans le sang artériel ( $\text{CaO}_2$ ) est réduite par l'hypoxie, par le blocage d'une partie de l'hémoglobine par le monoxyde de carbone, ou par la diminution du volume sanguin. En revanche, il augmente après autotransfusion sanguine ou quand la pression de l'oxygène inspiré s'élève. Ainsi, l'amélioration de la performance aérobique procède d'un double effet, à la fois sur le système de transport de l'oxygène et sur le potentiel oxydatif cellulaire (Van Praagh, 1996).

La première façon d'améliorer les capacités de transport de l'oxygène est de s'entraîner en altitude. En effet, ce type d'entraînement conduit rapidement à une hypoxie tissulaire. On observe alors une réduction initiale du volume plasmatique, accompagnée d'une augmentation des érythrocytes et de l'hémoglobine. Cette adaptation est bénéfique dans les conditions de repos et au cours d'exercices peu intensifs. Toutefois, l'effet bénéfique réel d'un entraînement en altitude sur la performance aérobique réalisée au niveau de la mer est encore très controversé.

Une autre méthode consiste à augmenter artificiellement le volume érythrocytaire total d'un sujet. Ce dopage sanguin peut se faire par réinjection de ses propres globules rouges (autotransfusion) ou par un donneur ayant le même groupe sanguin (transfusion homologue). Des études ont montré une amélioration significative de la consommation maximale de l'oxygène ( $\text{VO}_2\text{max}$ ), accompagnée d'une amélioration de la performance en course à pied (environ 23%) et en ski de fond (Van Praagh, 1996). Mais les risques associés au dopage sont nombreux (réactions allergiques, hépatites, SIDA) et son utilisation est proscrite en tant que moyen ergogénique chez l'athlète. L'érythropoïétine recombinante évite ces risques tout en conservant la capacité d'augmenter la consommation maximale de l'oxygène ( $\text{VO}_2\text{max}$ ) (Van Praagh, 1996 ; Gareau *et al.*, 1996). Après un traitement de six semaines, à raison de trois injections d'érythropoïétine par semaine, le  $\text{VO}_2\text{max}$  s'élève

d'environ 7%. Cette augmentation cesse deux semaines après l'arrêt du traitement à l'érythropoïétine humaine recombinante.

Mais si ces effets sont très recherchés par certains athlètes, les effets secondaires de l'érythropoïétine humaine recombinante peuvent s'avérer dramatiques. Plusieurs décès de cyclistes professionnels ont été attribués à un abus de cette substance dopante formellement interdite par le comité international olympique (Van Praagh, 1996 ; Gareau *et al.*, 1996) mais pour l'instant il s'agit d'allégations, faute de preuve. L'hématocrite peut en effet augmenter brutalement, provoquant l'apparition de thrombose vasculaire (formation de caillots sanguins), y compris d'accident vasculaire cérébral, d'encéphalopathie ou de coma (Van Praagh, 1996).

Le dépistage du dopage à l'érythropoïétine reste un défi pour les laboratoires. Le problème essentiel réside dans la mise en évidence de l'érythropoïétine injectée (en tant que produit dopant) puisque d'une part, cette molécule ne se distingue pas de la molécule naturelle et que d'autre part, son effet direct n'est apparent que quelques jours après son injection alors que la molécule a disparu de la circulation sanguine après quelques heures. La mesure des produits de dégradation de la fibrine dans les urines (Van Praagh, 1996) ou encore le dosage du taux de récepteur soluble de la transferrine et de la ferritine dans le sang (Gareau *et al.*, 1996) pourrait être la solution du problème.

## 6. Objectif de notre travail

S'il peut être postulé que la structure d'une protéine recombinante est, dans l'immense majorité des cas, identique à celle de la protéine naturelle, il n'en est pas de même pour une glycoprotéine recombinante.

Cela s'explique par le fait que l'ordre d'enchaînement des acides aminés d'une protéine est dicté par l'enchaînement des nucléotides de l'ARNm correspondant et que le code génétique chez les eucaryotes, qui permet de traduire un codon en un acide aminé, est universel.

La production d'une glycoprotéine recombinante nécessite, de la part de la cellule, de disposer de la « machinerie » nécessaire à la synthèse de la copule glucidique. Or, nous avons vu que la synthèse d'une chaîne glycanique n'obéissait pas à des règles strictes et universelles (comme celle d'une protéine) mais était dépendante de nombreux paramètres comme le type de la cellule choisie, son équipement enzymatique (glycosyltransférases), les conditions de culture et bien d'autres facteurs non encore élucidés à ce jour. Nous avons, lors de la présentation détaillée de la structure des chaînes glycaniques des différentes érythropoïétines humaines recombinantes produites à ce jour (chapitre 3, page 37), montré que des différences majeures étaient parfois observées suivant que la production se faisait à partir de cellules CHO, BHK, Namalwa ou encore végétales (tabac).

De 1985 à 1990, l'équipe dirigée par J.-P. Cartron à l'INTS (Institut National de Transfusion Sanguine) a cloné l'ADNc de l'érythropoïétine humaine et l'a intégré dans des cellules humaines issues d'une lignée lymphoblastoïde : la lignée RPMI 1788. La valorisation de cette nouvelle molécule d'érythropoïétine a été réalisée dans un premier temps par le CRTS (Centre Régional de Transfusion Sanguine) de Lille à partir de 1991. L'objectif était de mettre au point un procédé de production à l'échelle industrielle de cette

molécule : création de banques cellulaires, mise au point d'un procédé de culture cellulaire à grande échelle en cytotuteur, définition d'un protocole de purification par chromatographie d'immuno-affinité, caractérisation de l'activité biologique.

En 1993, l'organisation de la transfusion sanguine française a été complètement restructurée avec en particulier la création en 1994 du LFB : Laboratoire Français du Fractionnement et des Biotechnologies. Le LFB est le seul opérateur industriel en France à se consacrer exclusivement à la production des médicaments dérivés du sang. De par sa mission il a donc repris ce travail de développement d'une nouvelle molécule d'érythropoïétine .

Une question précise a alors été posée par l'industriel : cette molécule d'érythropoïétine produite dans des cellules humaines présente-t-elle une originalité structurale par rapport aux autres molécules produites dans des cellules animales telles que CHO ? En cas de réponse positive, un brevet pourrait être déposé et permettrait alors d'envisager une valorisation de cette molécule. Une étude de la structure de la nouvelle molécule d'érythropoïétine a donc été entreprise avec en particulier une analyse des glycanes. De plus, un travail a été réalisé pour voir si les conditions de culture (milieux de culture, type de cytotuteur, procédé de récolte des surnageants de culture) pouvaient avoir une influence sur la structure glycanique de la molécule d'érythropoïétine. Pour cela, deux milieux de culture différents (avec ou sans sérum de veau foetal) et deux conditions de culture (cytotuteur de type « batch » et cytotuteur à perfusion) ont été utilisés pour produire cette molécule. Ainsi, trois érythropoïétines humaines recombinantes, nommées 97P16, 97P19 et 97P22, ont été obtenues. Les tests d'activité biologique *in vitro* et *in vivo* entrepris en 1995, révèlent que cette molécule d'érythropoïétine humaine recombinante produite est biologiquement active. C'est l'étude de la glycosylation des molécules produites qui m'a été confiée dans le cadre d'une convention CIFRE signée entre le LFB de Lille et le laboratoire de Chimie Biologique (UMR n°8576 du CNRS) de l'USTL.



**MATERIELS  
ET  
METHODES**

## **1. Matériel**

Les érythropoïétines humaines recombinantes ont été produites par le Laboratoire Français du Fractionnement et des Biotechnologies de Lille (LFB) qui utilise des cellules humaines issues d'une lignée lymphoblastoïde B (RPMI 1788, Réf: ATCC CCL 15b) transformée par un vecteur d'expression pTS39 contenant le gène de l'érythropoïétine (Brevet INTS-PCT n° 91/00636 du 1<sup>er</sup> août 1991).

Deux milieux de culture différents et deux modes de culture différents ont été utilisés. L'érythropoïétine humaine recombinante nommée 97P16 a été produite dans un cytotqueur régulé (240 l) par culture en suspension en mode discontinu de type « batch » dans un milieu EM (composition LFB) avec 1% de sérum de veau foetal.

L'érythropoïétine humaine recombinante 97P19 a été produite dans un cytotqueur à perfusion de 20 l, en utilisant le milieu de culture EM renfermant 1% de sérum de veau foetal. Quant à l'érythropoïétine humaine recombinante nommée 97P22, elle a été obtenue dans les mêmes conditions que l'érythropoïétine 97P19 mais en absence de sérum de veau foetal.

Les 3 érythropoïétines humaines recombinantes ont ensuite été purifiées par chromatographie d'immunoaffinité avec un anticorps anti-érythropoïétine de lapin fixé sur un gel de Sépharose-CNBr (Pharmacia), suivie d'une chromatographie d'échange d'ions sur DEAE-sépharose (Fast Flow, Pharmacia) et d'une chromatographie de tamisage moléculaire sur un gel Sephacryl S200 (Pharmacia).

La dernière étape chromatographique permet de récupérer chaque érythropoïétine humaine recombinante en eau.

## **2. Composition molaire en monosaccharides**

Les 3 érythropoïétines humaines recombinantes (50µg) ont été remises en solution dans 1 mL d'une solution de lysine à 5 µg.mL<sup>-1</sup> (utilisée comme standard interne). Après lyophilisation, une solution de Méthanol/HCl 0,5 M a été ajoutée et la méthanolyse a été conduite pendant 16 heures à 80°C.

Les différents monosaccharides libérés sous forme de méthylglycosides ont ensuite été alkylés par l'heptafluorobutyrate selon la méthode de Zanetta *et al.* (1998, sous presse). Brièvement, le Méthanol/HCl 0,5 M est éliminé par un flux d'azote et le résidu sec est repris dans 200 µL d'acétonitrile. L'anhydride heptafluorobutyrique (25 µL) est ajouté et le tube est porté à 100°C pendant 30 minutes. Après séchage à sec, 50 µL d'acétonitrile séché sur du chlorure de calcium ont été ajoutés et les méthylglycosides heptafluorobutylés ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse. Pour cela, 2 µL de milieu réactionnel ont été déposés sur l'injecteur de Ross d'un chromatographe de phase gazeuse GC-14A de chez Shimadzu. La colonne est une colonne capillaire de 25 m (25QC3/BP1 ; 0,5 µm d'épaisseur de phase, SGE, France). La température de l'injecteur et du détecteur était de 260°C. Les dérivés méthylglycosides ont été élués grâce à un gradient de température de 100 à 140°C avec un pas de 1,2°C.min<sup>-1</sup> suivi d'un gradient de 140 à 240°C avec un pas de 4°C.min<sup>-1</sup> et détectés grâce à un détecteur à ionisation de flamme. Le gaz vecteur était de l'hélium à une pression de 0,8 bar.

## **3. Etude qualitative des acides sialiques**

### **3.1. Désialylation chimique**

Cent microgrammes de glycoprotéines ou glycopeptides ont été dissous dans 200 µL d'une solution d'acide acétique 2 M. Après incubation pendant 3 heures à 80°C, le mélange réactionnel a été refroidi puis déposé sur une cellule centricon-3 (Amicon). Après

centrifugation à 6500 g pendant 1 heure, deux lavages successifs à l'eau (1 mL) ont été effectués. Le dialysat a été recueilli et lyophilisé.

### **3.2. Dérivation et analyse des acides sialiques libres**

Le couplage des acides sialiques avec le chlorhydrate de 1,2-diamino-4,5-méthylènedioxybenzène (DMB) a été effectué selon la procédure décrite par Hara *et al.* (1987). Après lyophilisation, les acides sialiques ont été repris dans 100 µL d'eau et la réaction de couplage a été effectuée en ajoutant à 10 µL de la solution d'acide sialique précédente, 10 µL de la solution de DMB préparée extemporanément. Après chauffage à 50°C pendant 2h30 à l'obscurité, le mélange réactionnel (5 µL) a été analysé par HPLC en phase inversée en utilisant une colonne C18 Vydac (250 x 2,1 mm, 5 µm) à un débit de 0,4 ml.min<sup>-1</sup>. L'élution des différents dérivés d'acide sialique a été faite en accord avec la procédure de Hara par HPLC. Leur détection a été assurée par un fluorimètre à une longueur d'onde d'excitation de 374 nm et d'émission de 448 nm.

## **4. Etudes de la glycosylation des trois érythropoïétines humaines recombinantes**

### **4.1. Réduction et alkylation des érythropoïétines**

Chacune des 3 érythropoïétines humaines recombinantes lyophilisées (1 mg) a été solubilisée dans 100 µL d'une solution de chlorhydrate de guanidine 6M, renfermant du bicarbonate d'ammonium 0,1 M (pH 8,0) et placée sous atmosphère d'argon. Dix µL d'une solution de dithiothréitol à 10 mg/mL ont été ajoutés et le mélange a été maintenu à 37°C pendant 1 heure sous agitation. L'alkylation des groupements thiols a été faite pendant 1 heure à 37°C en ajoutant 1 µL de 4-vinylpyridine à l'échantillon.

Les érythropoïétines humaines recombinantes réduites et alkylées ont ensuite été dessalées par dialyse sur des cellules centricon-10 (Amicon) ayant un seuil de coupure de 10000 Da.

Dix lavages successifs à l'eau (1mL) ont été effectués. Les 3 érythropoïétines humaines recombinantes ont été récupérées et lyophilisées.

#### **4.2. Hydrolyse enzymatique par l'endoprotéinase Glu-C**

Les 3 érythropoïétines humaines recombinantes réduites et alkylées ont été hydrolysées par l'endoprotéinase Glu-C (Boehringer Mannheim) (E.C. 3.4.21.19). Pour cela, 5 mg d'érythropoïétine ont été dissous dans 1 ml de tampon bicarbonate de sodium 50 mM pH 7,8 et l'enzyme a été ajoutée pour obtenir un rapport final enzyme/substrat de 1/40<sup>e</sup> (poids/poids). La digestion enzymatique a été effectuée pendant 8 heures à 37°C sous agitation.

#### **4.3. Séparation des peptides et glycopeptides**

Les peptides et glycopeptides générés à partir de chacune des 3 érythropoïétines humaines recombinantes ont été séparés par HPLC en phase inversée sur une colonne C18 Vydac (250 x 4,6 mm, 5 µm). Pour cela 1/10<sup>e</sup> de l'échantillon a été injecté sur la colonne préalablement équilibrée dans de l'eau renfermant 0,05% d'acide trifluoroacétique. L'élution a été effectuée par un gradient linéaire d'acétonitrile à 60% dans l'eau renfermant 0,05% d'acide trifluoroacétique et suivie à 214 nm. Le débit était de 0,7 ml/min. Les différents peptides et glycopeptides ont été collectés manuellement, puis lyophilisés.

#### **4.4. Electrophorèse capillaire**

L'hydrolysat obtenu après hydrolyse par l'endoprotéinase Glu-C a été analysé sur une électrophorèse capillaire (Beckman) P/ace system 5500. Un capillaire de 57 cm (50 µm D.I.) en silice fondu a été utilisé. L'injection des hydrolysats a été faite sous une pression de 20 psi pendant 5 secondes. Les séparations ont été effectuées dans un tampon phosphate

100 mM pH 2,5 sous une tension de 20 kV pendant 1 heure. La migration électrophorétique a été suivie à 206 nm.

#### **4.5. Séquençage peptidique**

Les glycopeptides ont été séquencés sur un séquenceur automatique Applied Biosystems 473A.

Les échantillons ont été repris dans une solution d'ATFA à 0,1% (15 à 30  $\mu$ l) avant d'être déposés sur une membrane en fibre de verre activée par de l'ATFA anhydre et sur laquelle 3 cycles préalables de séquençage (couplage + clivage + lavages) avaient été effectués.

Dans ce séquenceur, la réaction de couplage de l'acide aminé N-terminal avec le phénylisothiocyanate (PITC) est réalisée en présence de N-méthylpipéridine à 43°C.

Après clivage par l'ATFA anhydre, les anilinothiazolinone-acides aminés (ATZ-AA) libérés sont transférés dans la flasque de conversion où ils sont convertis à 61°C pendant 20 minutes en PTH-AA (phénylthiohydantoïne-amino acides) grâce à une solution d'ATFA à 25%. Les PTH-AA sont ensuite analysés par CLHP (Applied Biosystems 610A) sur une colonne Brownlee C18 (220 x 2,1 mm) maintenue à 55°C. L'élution des PTH-AA a été assurée par un gradient d'acétonitrile selon les recommandations du constructeur et suivie à 269 nm.

#### **4.6. Analyse des glycopeptides par ES-MS et LC-MS**

Les spectres de masse ont été acquis sur un appareil triple quadripôles Quattro-II Micromass (Angleterre).

Pour l'analyse des glycopeptides en mode infusion, l'échantillon a été dissous dans une solution de méthanol/eau/acide acétique (49/49/2) de façon à obtenir une concentration en glycopeptides de 14 pmoles/ $\mu$ L, puis introduit dans la source du spectromètre de masse (maintenue à 80°C) à un débit de 3  $\mu$ L/min. Le débit du gaz de séchage (azote) a été fixé à

200 L/h et le courant de nébulisation à 15 L/h (azote). Une tension de 65 V a été appliquée au cône. La gamme de masse balayée était de 600 à 1500 u.m.a..

Pour les analyses effectuées en mode LC-MS (couplage direct de l'HPLC au spectromètre de masse), le débit du gaz de séchage (azote) utilisé a été fixé à 300 L/h et le courant de nébulisation à 15 L/h (azote). Une tension de 70 V a été appliquée sur le cône ; la température de la source était de 120°C. La gamme de masse balayée était de 1000 à 2600 u.m.a.. La colonne utilisée était une colonne Vydac C18 (250 x 2,1 mm, 5 µm) maintenue à 25°C en utilisant un appareil de CLHP HP1100 (Hewlett Packard). Le débit de solvant était de 150 µl.min<sup>-1</sup>. Les échantillons (20 µl) ont été injectés sur la colonne équilibrée dans une solution d'ATFA à 0,05% dans l'eau et l'élution du glycopeptide a été faite par un gradient linéaire d'acétonitrile additionné d'ATFA à 0,05% (de 0 à 100% en 5 minutes). En parallèle de l'enregistrement du courant ionique total, la détection des glycopeptides a également été réalisée en UV à 215 nm.

# RESULTATS



# 1. Composition en monosaccharides des trois lots d'érythropoïétine

## 1.1. Méthode utilisée

Parmi les nombreuses techniques de détermination de la composition molaire en monosaccharides de glycanes ou oligosaccharides, la technique la plus couramment utilisée au laboratoire consistait à analyser par chromatographie en phase gazeuse (CPG) les différents monosaccharides transformés en leur dérivé méthylglycoside triméthylsilylé selon la méthode de Kamerling *et al.* (1975) modifiée par Montreuil *et al.* (1986). Cette méthode, quoique très sensible, présente quelques inconvénients :

- i) La triméthylsilylation d'un groupement amine est très difficile ; or, les sucres aminés N-acétylés avant la méthanolyse sont libérés avec leur groupement amine libre et protoné. Il est alors nécessaire de procéder à une étape préalable de N-réacétylation de la fonction amine qui n'est quantitative qu'en absence de sels contaminants.
- ii) La stabilité thermique des monosaccharides sialylés dans l'injecteur nécessaire à l'analyse par CPG n'est bonne que si l'injecteur est exempt de contamination (sels, etc...). Malencontreusement, la présence de contaminants dans l'injecteur est inéluctable rendant rapidement imprécises les analyses surtout au niveau des sucres aminés.

Récemment, Zanetta *et al.* (Glycobiology, sous presse) ont mis au point une nouvelle procédure de dérivation des monosaccharides en utilisant l'anhydride heptafluorobutyrique qui présente les avantages suivants :

- i) La réaction d'acylation par l'anhydride heptafluorobutyrique est aussi efficace sur une fonction amine que sur un groupement hydroxyl, même en présence de sels contaminants. La substitution se fait donc en une seule étape et conduit à des dérivations quantitatives sur les oses neutres mais aussi sur les oses aminés quelles que soient les conditions de pureté de l'échantillon.

**Tableau 1 :** Composition molaire en monosaccharides des 3 érythropoïétines humaines recombinantes 97P16, 97P19 et 97P22 calculée sur la base de 3 mannoses.

érythropoïétine humaine recombinante	Fucose	Galactose	Mannose	GalNAc	GlcNAc	Acide sialique	pourcentage de glycosylation
97P16	1,4	6,0	3	0,2	8,3	3,1	28,1
97P19	1,2	5,9	3	0,3	8,0	3,4	29,1
97P22	1,5	6,2	3	0,3	8,7	3,2	30,2

ii) La stabilité thermique des monosaccharides trifluoroacétylés est très bonne conduisant à des analyses CPG très reproductibles et très précises, même dans le temps.

Notre objectif étant d'une part de déterminer la composition en monosaccharides d'érythropoïétine recombinante (dont on sait que les glycannes se caractérisent par un taux élevé de N-acétylglucosamine et d'acides sialiques (Tsuda *et al.*, 1988 ; Takeuchi *et al.*, 1988)) et d'autre part de comparer trois lots de production différents d'érythropoïétine humaine recombinante, cette nouvelle méthode nous est parue particulièrement bien adaptée à notre étude.

## 1.2. Résultats-discussion

Après méthanolyse des trois érythropoïétines humaines recombinantes (lots 97P16, 97P19 et 97P22), les monosaccharides libérés ont été dérivés par l'anhydride heptafluorobutyrique et analysés par chromatographie en phase gazeuse (CPG). Le tableau 1 présente les rapports molaires des différents monosaccharides constitutifs des trois érythropoïétines humaines recombinantes établis sur la base de trois résidus de mannose par molécule ainsi que le taux de glycosylation exprimé en microgramme de monosaccharides pour 100 µg de glycoprotéine. Dans les trois érythropoïétines humaines recombinantes étudiées, nous constatons la présence de fucose, de mannose, de galactose, de N-acétylgalactosamine, de N-acétylglucosamine et de l'acide N-acétylneuraminique.

Les résidus de N-acétylgalactosamine indiquent la présence de O-glycannes alors que la présence de résidu de mannose indique la présence de structures N-glycanniques.

Le rapport molaire de 1,4 pour le fucose indique la présence de N-glycannes monofucosylés et pour certains difucosylés. L'existence de chaînes glycanniques difucosylées constitue une première surprise dans le sens où, à ce jour, toutes les structures N-glycanniques décrites

pour les érythropoïétines naturelles ou recombinantes ne faisaient apparaître qu'un seul résidu de fucose par glycanne.

Si l'on considère que tous les N-glycannes sont de type complexe tétraantenné, cela signifie que sur la base de trois mannoses, la composition molaire en monosaccharides doit donner 4 résidus de galactose. Or, le taux obtenu apparaît très supérieur, ce qui indique un taux d'antennarisation élevé avec la présence de répétitions N-acétyllactosaminiques au sein des N-glycannes. Cette hypothèse est confirmée par un taux également élevé de N-acétylglucosamine. En effet, la présence de 6 galactoses par molécule implique qu'au moins 6 résidus de N-acétylglucosamine soient présents. Si l'on tient compte des N-acétylglucosamines du noyau, hormis celle du point d'attache qui n'est que très faiblement détectée lors de l'analyse chromatographique, nous atteignons un taux théorique de 7 résidus par molécule. Or, des taux proches de 8 sont obtenus pour les 3 érythropoïétines humaines recombinantes étudiées. Comme nous le verrons ultérieurement, ce taux élevé est dû à la présence de N-acétylglucosamine intercalaire.

Enfin, on note un taux d'acide sialique supérieur à 3 pour les trois érythropoïétines humaines recombinantes ce qui indique la présence moyenne de 3 résidus d'acides sialiques par N-glycanne.

L'érythropoïétine 97P22 apparaît la plus glycosylée avec un taux de glycosylation de 30%, suivie de l'érythropoïétine 97P19 (29%) et de l'érythropoïétine 97P16 (28%). Toutefois, comme l'indiquent ces valeurs, la différence entre ces taux est faible.

A la vue de ces résultats, plusieurs conclusions peuvent être tirées :

- i) les 3 érythropoïétines humaines recombinantes apparaissent très similaires,
- ii) elles possèdent une proportion non négligeable de glycannes difucosylés,

- iii) conformément aux données bibliographiques, les chaînes glycaniques apparaissent fortement antennarisées avec pour certaines la présence de répétitions N-acétyllactosaminiques,
- iv) un taux élevé de sialylation qui caractérise l'érythropoïétine et confirme le haut degré d'antennarisation.

## 2. Etude de la sialylation

### 2.1. Analyse quantitative

#### 2.1.1. Détermination du taux de sialylation et du pourcentage de liaison $\alpha$ - (2→3)/ $\alpha$ -(2→6)

Si la nature de la liaison entre deux acides aminés est unique (condensation de la fonction  $\alpha$  aminée d'un acide aminé avec la fonction  $\alpha$  carboxylique d'un autre acide aminé), il n'en est pas de même pour la liaison entre deux monosaccharides. C'est ainsi qu'il existe trois types de liaison sialyle :  $\alpha$ -(2→3),  $\alpha$ -(2→6) ou  $\alpha$ -(2→8) (cette dernière ne concerne que les chaînes polysialyles).

La procédure de méthylation des glycanes, suivie de l'analyse des différents dérivés partiellement méthylés et acétylés obtenus après méthanolyse, constitue l'une des meilleures techniques pour l'étude du type de la liaison osidique entre 2 monosaccharides.

Dans le cas de N-glycanes sialylés pour lesquels les résidus de galactose sont substitués uniquement par des acides sialiques, la mise en œuvre de cette procédure permet de connaître le type de la liaison sialyle. Une liaison  $\alpha$ -(2→3) sera révélée par la présence d'un dérivé méthylé de galactose substitué sur l'hydroxyl de son carbone 3 alors qu'une liaison  $\alpha$ -(2→6) le sera par la présence d'un dérivé méthylé de galactose substitué sur l'hydroxyl de son carbone 6.

Dans le cas particulier de l'érythropoïétine, pour laquelle ont été décrites des structures glycaniques sialylées possédant des répétitions N-acétyllactosaminiques, la mise en œuvre directe de cette méthode n'est plus possible. En effet dans de tels glycanes, le chaînon N-acétyllactosaminique qui est lié à un résidu de galactose par une liaison  $\beta$ -(1→3) conduira à un dérivé méthylé de galactose également substitué sur l'hydroxyl de son carbone 3. Il devient dès lors impossible de corrélérer la présence de ce dérivé méthylé uniquement à la substitution d'un galactose par un acide sialique via une liaison  $\alpha$ -(2→3).

Afin de déterminer très précisément le taux de liaison sialyle  $\alpha$ -(2→3) et /ou  $\alpha$ -(2→6) des chaînes glycaniques des 3 érythropoïétines, nous avons développé au laboratoire une stratégie qui, outre le fait de permettre cette détermination, permet également de connaître le taux de sialylation des chaînes glycaniques.

Cette stratégie, qui a fait l'objet d'une publication dans *Carbohydrate Research* (sous presse), est présentée dans les pages suivantes.

**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**

Didier Cointe, Yves Leroy, Frédéric Chirat\*

*Laboratoire de Chimie Biologique et Unité Mixte de Recherche du CNRS N° 111,  
Université des Sciences et Technologies de Lille, F-59655 Villeneuve d'Ascq, France*

\*To whom correspondence should be addressed, Phone: (33) 3 20/33/72/41

Fax : (33) 3 20/43/65/55

E-mail : Frederic.chirat@univ-lille1.fr

*Keywords : Sialic acid; methylation; sialylation level; Sialyl linkag; Mass spectrometry*

**Abbreviations**

LNT, LcOse<sub>4</sub> ( $\beta$ -D-Galp-(1→3)- $\beta$ -D-GlcpNAc-(1→3)- $\beta$ -D-Galp-(1→4)-D-Glcp);

LSTa, IV<sup>3</sup>NeuAcLcOse<sub>4</sub> ( $\alpha$ -Neup5Ac-(2→3)- $\beta$ -D-Galp-(1→3)- $\beta$ -D-GlcpNAc-(1→3)- $\beta$ -D-Galp-(1→4)-D-Glcp);

LSTc, IV<sup>6</sup>NeuAcnLcOse<sub>4</sub> ( $\alpha$ -Neup5Ac-(2→6)- $\beta$ -D-Galp-(1→4)- $\beta$ -D-GlcpNAc-(1→3)- $\beta$ -D-Galp-(1→4)-D-Glcp).

## ABSTRACT

A methodology for the determination of the sialylation pattern of *N*-glycans, extent of sialylation and the ratio between  $\alpha$ -(2→3) and  $\alpha$ -(2→6) sialyl linkages, is presented based on the labelling of the C-3 and C-6 hydroxyl groups of Gal residues obtained after permethylation, saponification, selective desialylation of sialylated oligosaccharides and methanolysis. Deuteromethylation and GC/MS analysis of Gal derivatives allow to determine the sialylation level of glycans. *O*-Ethyl ether labelling followed by GC analysis of the resulting Gal derivatives allows to get the ratio of  $\alpha$ -(2→3) and  $\alpha$ -(2→6) sialyl linkages. The method was applied to LNT (LcOse<sub>4</sub> :  $\beta$ -D-Galp-(1→3)- $\beta$ -D-GlcpNAc-(1→3)- $\beta$ -D-Galp-(1→4)-D-Glcp), LSTa (IV<sup>3</sup>NeuAcLcOse<sub>4</sub> :  $\alpha$ -Neup5Ac-(2→3)- $\beta$ -D-Galp-(1→3)- $\beta$ -D-GlcpNAc-(1→3)- $\beta$ -D-Galp-(1→4)-D-Glcp), LSTc (IV<sup>6</sup>NeuAcnLcOse<sub>4</sub> :  $\alpha$ -Neup5Ac-(2→6)- $\beta$ -D-Galp-(1→4)- $\beta$ -D-GlcpNAc-(1→3)- $\beta$ -D-Galp-(1→4)-D-Glcp) and a bisialylated biantennary *N*-glycan in which sialic acid is bound to Gal residues via an  $\alpha$ -(2→6) linkage.

Using this method, it was found that 92.8% of *N*-glycans in bovine fetuin is sialylated and that the ratio of  $\alpha$ -(2→6) /  $\alpha$ -(2→3) and sialyl linkages was 31 / 19.



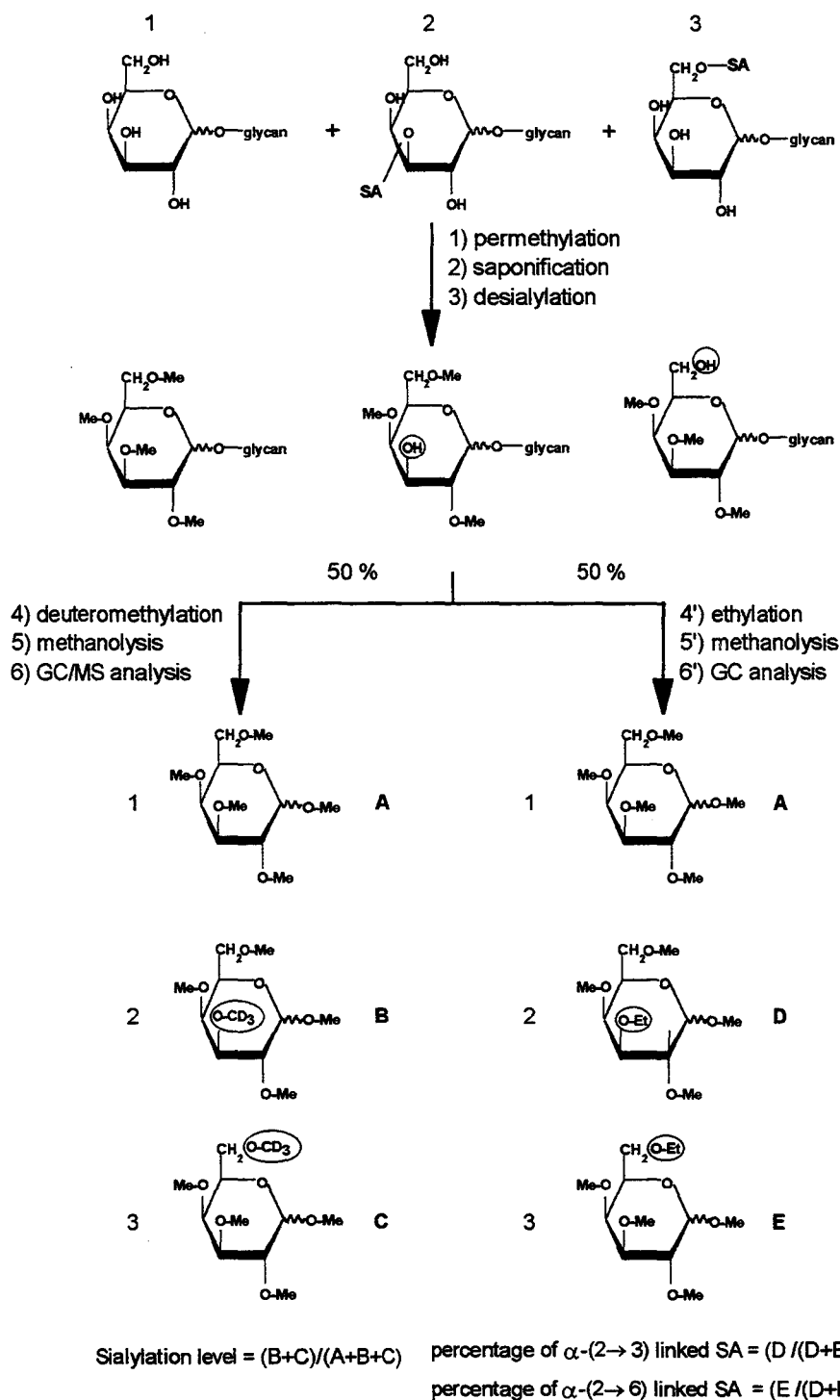
## 1. Introduction

Several methods [1-3] have been described for the quantitative and qualitative study of sialic acids. There are also different methods to discriminate between  $\alpha$ -(2→3) and  $\alpha$ -(2→6) linkages. For instance, monoclonal antibodies directed against the Neu5Ac  $\alpha$ -(2→6) Gal epitope have been used for the study of glycosphingolipid sialylation [4]. Sialidases, in particular sialidase isolated from Newcastle Disease Virus (E.C. 3.2.1.18) which is specific of  $\alpha$ -(2→3) sialyl linkage [5], can be used for this purpose. However, since there is no sialidase specific of the  $\alpha$ -(2→6) sialyl linkage, the direct determination of the proportion of such linkage is not possible. Moreover, some peculiar sialic acid residues (e.g. *O*-acetylated) can be resistant to enzymatic cleavage making this approach non quantitative. An HPLC method, based on the use of three successive HPLC columns [6] was proposed to structurally characterize the different oligosaccharide chains of a glycoprotein. The authors were able to clearly differentiate closely related Neu5Ac containing oligosaccharides involving  $\alpha$ -(2→3) and  $\alpha$ -(2→6) linkages. A discrimination between these two kinds of sialyl linkage can also be obtained by collisional-activation tandem mass spectrometry of methylated oligosaccharides [7]. All these methods require either purified glycans or to proceed with two separate analyses. In contrast, two other methods, NMR spectroscopy and methylation analyses, can be carried out on a mixture of oligosaccharides. The first one, which involves high field  $^1\text{H}$ -NMR spectroscopy, was successfully introduced by Vliegthart et al. [8] to characterize glycoprotein structures. Among the structural-reporter groups which are clearly distinguishable for the determination of the structures, the H-3ax and the H-3eq atom resonances of Neu5Ac or Neu5Gc allow to define directly the linkage type and position in the carbohydrate chain. Such analyses generally require at least 10 nM of oligosaccharide or glycopeptide. However, it is possible to reduce this down to only a few  $\mu\text{g}$  of materials through the use of microprobes. The second method, which

involves methylation analysis, has been routinely used in many laboratories to study the carbohydrate glycosidic linkages [9]. When applied to classical sialylated *N*-glycans, in which terminal Gal residues are only substituted by sialic acids residues, it allows to assign both the sialylation level and the  $\alpha$ -(2→3)/ $\alpha$ -(2→6) sialyl linkage ratio of a glycoprotein. However, for some *N*-glycan chains, monosaccharides other than sialic acid (e.g. GlcNAc [10-11] or Gal [12]) can be linked to the terminal Gal residue. In this case, the method cannot be used for this purpose. In this paper, we propose a novel strategy to overcome this problem. The latter (Scheme 1) is based on deuteromethylation or ethylation of free Gal residue hydroxyl groups to determine unambiguously the sialylation level of a glycoprotein and the ratio of  $\alpha$ -(2→3) to  $\alpha$ -(2→6) sialic acid linkages.

A similar strategy was used to locate sulfate groups present in some oligosaccharide chains of recombinant human tissue plasminogen activator [13]. However, to our knowledge, it has never been applied to the study of sialic acid-containing oligosaccharides.

The study of *N*-glycan chain sialylation of fetuin was chosen as a first application of this strategy.



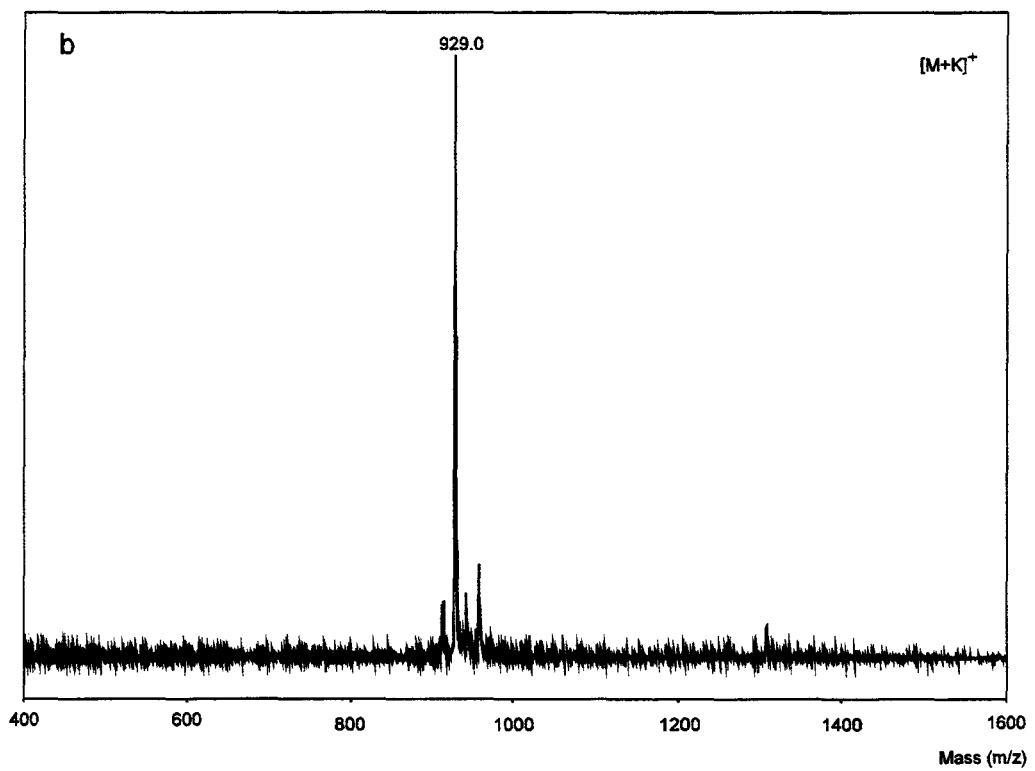
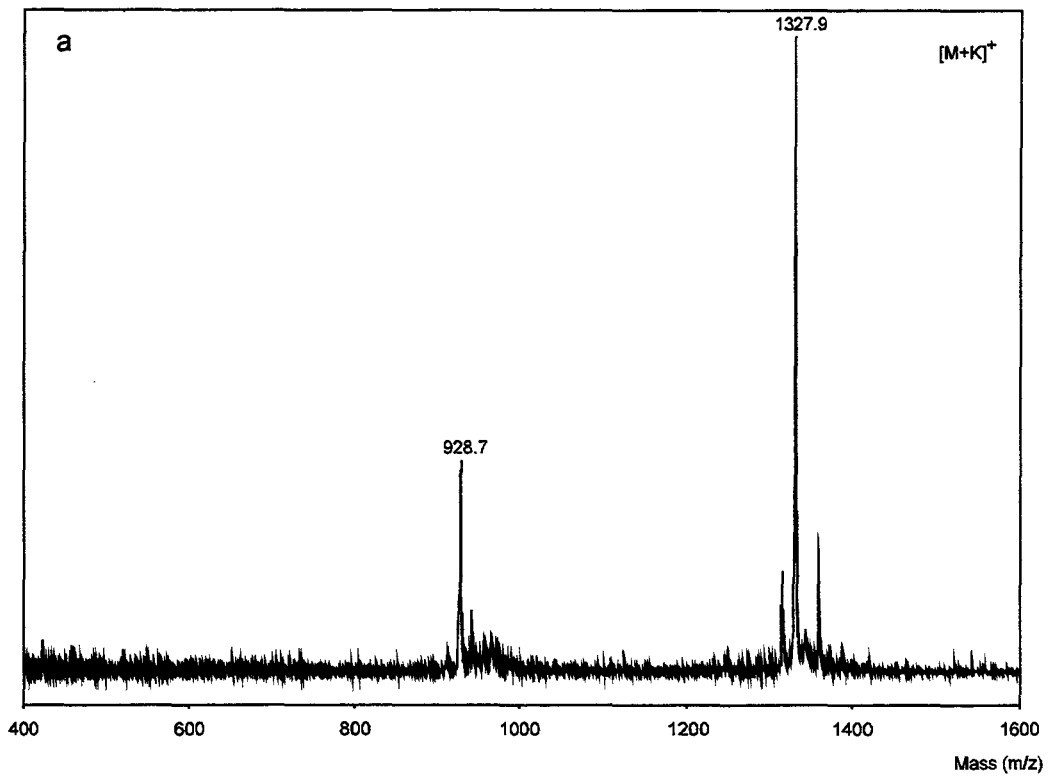
**Scheme 1 :** Strategy proposed for the determination of the sialylation level and the ratio  $\alpha$ -(2→3)/ $\alpha$ -(2→6) sialyl linkages. Samples (containing sialylated or unsialylated) were permethylated, saponified and selectively desialylated (steps 1, 2 and 3 respectively). Free hydroxyl groups of Gal residues are then labelled; 50% of the reaction mixture was deuteromethylated (step 4) whereas the remaining 50% was ethylated (step 4'). In the first case, partially deuteromethylated Gal residues, obtained by methanolysis (step 5), were analyzed by GC/MS (step 6) to determine the sialylation level of the glycoprotein. In the second case, partially ethylated galactose residues, obtained by methanolysis (step 5'), were analyzed by GC (step 6') to determine the ratio of  $\alpha$ -(2→3) to  $\alpha$ -(2→6) sialyl linkages.

## 2. Results and discussion

*Evaluation of the strategy with reference oligosaccharides.*-In order to establish the optimal conditions for each step of the strategy presented in Scheme 1, the protocols were developed using four reference compounds : LNT,  $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-GlcpNAc-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)-D-Glcp, LSTa,  $\alpha$ -Neup5Ac-(2 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-GlcpNAc-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)-D-Glcp, LSTc,  $\alpha$ -Neup5Ac-(2 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-GlcpNAc-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)-D-Glcp, and a bisialylated biantennary *N*-glycan in which sialic acid is bound to Gal residues through an  $\alpha$ -(2 $\rightarrow$ 6) linkage.

*Methylation, saponification and selective desialylation.*-LSTa and LSTc were permethylated and subsequently checked for complete methylation by MALDI-TOF. Application of a mild acid treatment (methanol-0.05 M HCl at 80°C for 1 h) in order to desialylate permethylated oligosaccharides leads, as observed by MALDI-TOF analysis, to several peaks corresponding to oligosaccharide fragments. Decreasing the temperature from 80°C to 60°C induced no change.

In order to quantitatively and selectively remove sialic acid residues, permethylated LSTa and LSTc oligosaccharides were saponified by alkali treatment with 0.1 M KOH in 4:1 ethanol-water for 4 h at 60°C. The MALDI-TOF mass spectrum obtained with LSTa (Fig. 1a) showed two major ions at  $m/z$  1327.9 and  $m/z$  928.7 corresponding respectively to the  $[M-H+2K]^+$  ion of the free acid and to the  $[M'+K]^+$  ion of the desialylated product ( $M'$ ). This last compound is probably generated by the acidic matrix (2,5-Dihydroxybenzoic acid) used for the MALDI-TOF analysis as suggested by Powell and Harvey [14]. This result confirms the stabilisation of the sialyl bond when the carboxyl group of sialic acid is esterified and justifies the modification introduced at the end of the methylation procedure (i.e. cooling of the reaction mixture, centrifugation to discard insoluble compounds (e.g.



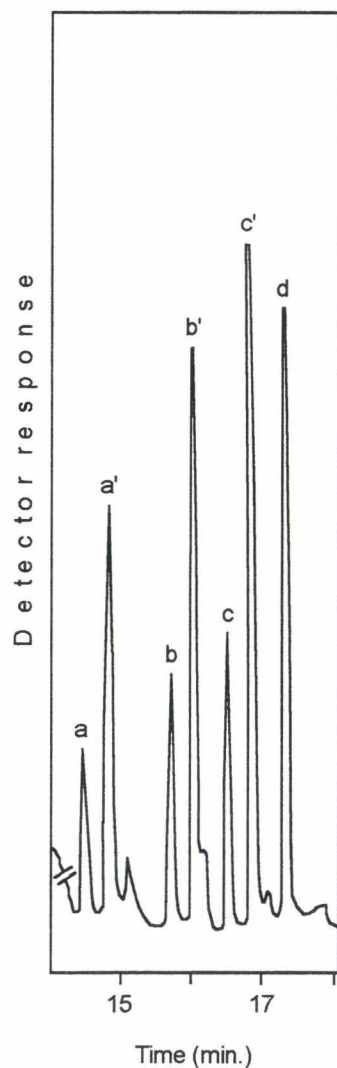
**Figure 1** : MALDI-TOF mass spectra of a) permethylated LSTa after alkali treatment and b) after acidic desialylation.

excess of NaOH, NaI) and acidification by a 5% acetic acid solution) in order to avoid saponification of the carboxymethyl group of sialic acids.

Treatment of saponified sialylated oligosaccharides with formic acid leads to their quantitative and selective desialylation as illustrated in Fig. 1b. The mass spectrum displays only one peak at  $m/z$  929.0 which corresponds to the calculated molecular mass of desialylated methylated LST (a or c). The free hydroxyl groups of the terminal galactose, generated during the desialylation step, were alkylated. For this purpose, one half of the sample was trideuteromethylated whereas the remaining part was ethylated. Samples were then treated with methanol-0.5 M HCl for 24 h at 80 °C, and the released methylglycosides were analyzed either by gas chromatography (GC) or by GC coupled to a mass spectrometer (GC/MS).

*Analysis of partially methylated and ethylated methyl galactopyranoside residues by gas chromatography.*-Several GC-columns were tested to separate the following methyl galactopyranosides : methyl tetra-*O*-methyl-D-galactopyranoside (Me4-Gal), methyl 3-*O*-ethyl-2,4,6-tri-*O*-methyl-D-galactopyranoside (3-Et-Gal) and methyl 6-*O*-ethyl-2,3,4-tri-*O*-methyl-D-galactopyranoside (6-Et-Gal). By using either a non-polar column (DB1 column), a weakly polar column (OV17 column) or a polar column (DB Wax column), coelution not only between some methyl galactopyranosides but also between the latter and other methyl glycopyranosides was observed. Complete separation of these three methyl galactopyranoside derivatives was achieved by coupling a DB Wax column to a DB1 column (Fig. 2).

Ethylated derivatives were identified on the basis of their molecular mass by GC/CIMS whereas the position of the ethyl group in the molecule was determined by GC/EIMS. The presence of an ethyl group on the C-6 hydroxyl group of a Gal residue leads to an H fragment [15] at  $m/z$  88, whereas on the C-3 hydroxyl group of a Gal residue, the H



**Figure 2 :** Chromatogram corresponding to the separation (anomeric forms) of Me<sub>4</sub>-Gal (peaks a and a'), 3-Et-Gal (peaks b and b'), 6-Et-Gal (peaks c and c') and methyl 2-*O*-acetyl-3,4,6-tri-*O*-methyl-D-mannopyranoside (peak d) residues co-injected on a DB Wax column coupled to a DB1 column. These monosaccharide derivatives were obtained as follows: Me<sub>4</sub>-Gal, methyl 2-*O*-acetyl-3,4,6-tri-*O*-methyl-D-mannopyranoside and 6-Et-Gal were generated from bisialylated biantennary *N*-glycan whereas 3-Et-Gal was generated from LST a.

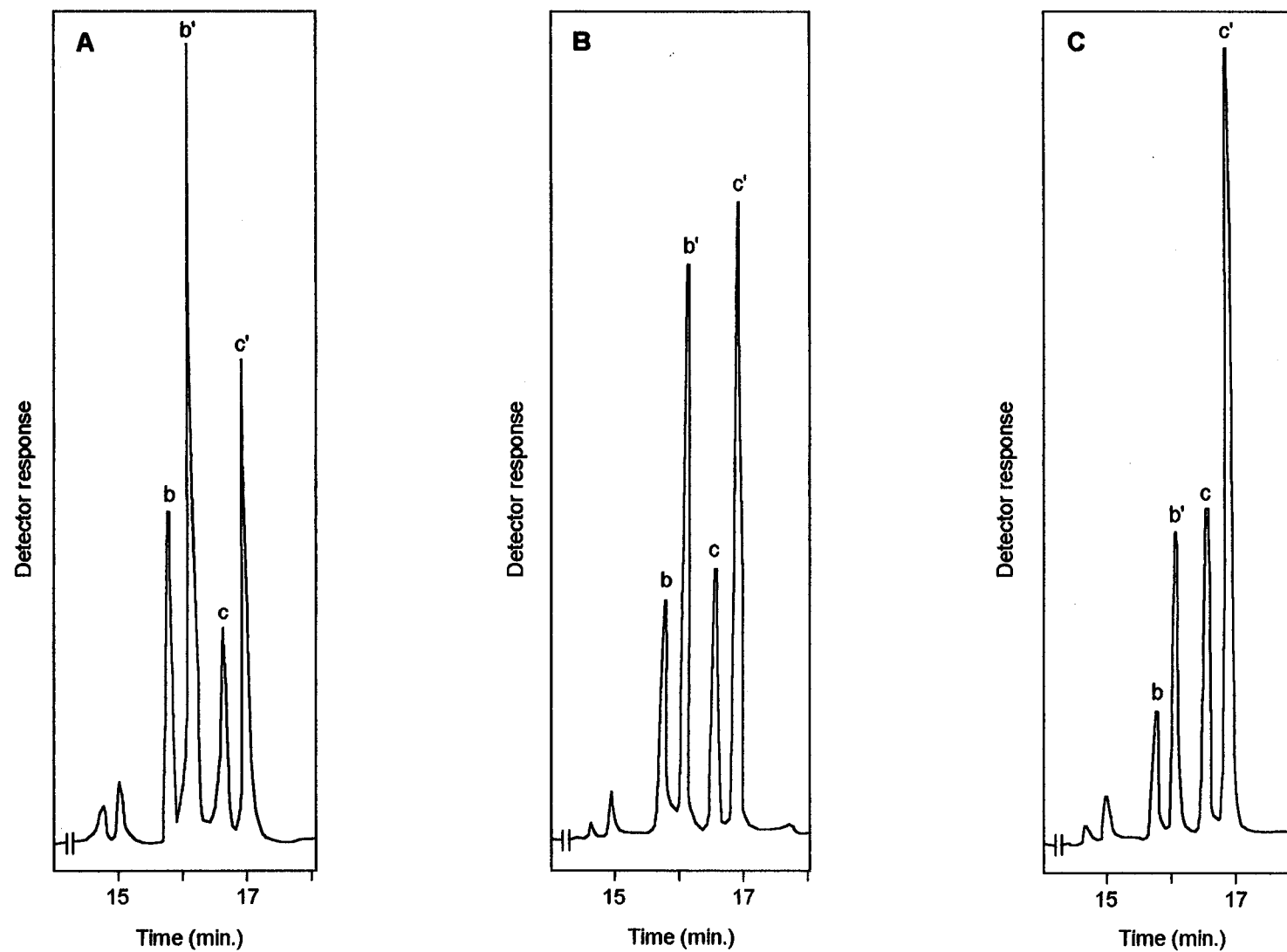
fragment is observed at  $m/z$  102. The  $m/z$  14 difference is due to the additional  $\text{CH}_2$  group in this fragment.

*Quantitative evaluation of ethylation labelling.*-To check the quantitative nature of the proposed strategy with respect to the  $\alpha$ -(2→3) vs  $\alpha$ -(2→6) sialyl linkage ratio, we prepared and analyzed three different mixtures of LSTa and LSTc containing 2/1, 1/1 and 1/2  $\alpha$ -(2→3) to  $\alpha$ -(2→6) sialyl linkage ratios. Results are presented in Fig. 3. From the area measured for each ethylated compound ( $\alpha$  and  $\beta$  anomers), the ratio of 3-Et-Gal to 6-Et-Gal was inferred. Results listed in Table 1 are in good agreement with the theoretical values although the level of 6-Et-Gal is slightly larger than the theoretical value. This difference is probably due to a higher quantity of LSTc in the 3 mixtures since the ratio of methyl 3-*O*-acetyl-2-deoxy-4,6-di-*O*-methyl-2-(*N*-methylacetamido)-*D*-glucopyranoside (specific of LSTa) to methyl 4-*O*-acetyl-2-deoxy-3,6-di-*O*-methyl-2-(*N*-methylacetamido)-*D*-glucopyranoside (specific of LSTc), calculated for each mixture, leads to similar values than those presented in table 1.

From these data, it can be concluded that the method allows an accurate quantification of sialic acid residues bound to galactose through an  $\alpha$ -(2→3) and/or an  $\alpha$ -(2→6) linkage.

*Determination of the degree of glycan sialylation.*-To determine the sialylation level of *N*-glycan-containing glycoproteins, the strategy described above was followed except for the labelling of the free hydroxyl group. Trideuteromethylation was used in place of ethylation. Following methanolysis, partially methylated and trideuteromethylated methyl galactopyranoside and Me<sub>4</sub>-Gal were analyzed by ammonia CIMS. Ammonia was chosen rather than methane or isobutane because ammonia CI spectra display predominantly  $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$  and very few fragment ions [16]. This feature is particularly important to precisely quantify the partially trideuteromethylated galactose residue (sialylated in the native glycan) and the permethylated galactose (not sialylated in the native glycan). To





**Figure 3 :** Gas-phase chromatograms of partially methylated and ethylated (3-Et-Gal or 6-Et-Gal) methyl galactopyranoside generated from synthetic mixtures of LSTa and LSTc in 2/1 ratio (A), 1/1 (B) and 1/2 (C). Identification of peaks is indicated in Fig. 2.

check our strategy, a 2:1 LNT-LSTc mixture was tested. Peak areas of  $[M+NH_4]^+$  ions at  $m/z$  271 and 268, named respectively A (139,415) and B (262,146) and peak areas of  $[M+H]^+$  ions at  $m/z$  254 and 251, named respectively A' (213,379) and B' (384,987) were recorded by ammonia GC/CIMS. From these data, sialylation levels of 34.7% ( $A/(A+B)$ ) and 35.7% ( $A'/(A'+B')$ ) were determined. These values are in good agreement with the theoretical value of 33.3%. As previously, the 2:1 LNT-LSTc weight ratio was confirmed by quantifying the methyl 3-*O*-acetyl-2-deoxy-4,6-di-*O*-methyl-2-(*N*-methylacetamido)-*D*-glucopyranoside (generated from LNT) and the methyl 4-*O*-acetyl-2-deoxy-3,6-di-*O*-methyl-2-(*N*-methylacetamido)-*D*-glucopyranoside (generated from LSTc).

*The case of sulphated and fucosylated oligosaccharides.* -Sialic acid residues, but also fucose residues and sulfate groups, are known to be labile in acidic conditions. To check that our strategy can be applied to sialylated sulfated and/or fucosylated oligosaccharides, the following oligosaccharide,  $\beta$ -*D*-Galp-(1 $\rightarrow$ 3)-[ $\alpha$ -*L*-Fucp-(1 $\rightarrow$ 4)]- $\beta$ -*D*-GlcNac-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -*D*-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)-[ $\alpha$ -*L*-Fucp-(1 $\rightarrow$ 3)]- $\beta$ -*D*-GlcNac-6-*O*-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -*D*-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)-*D*-GlcNac were analyzed in the same conditions than sialylated oligosaccharides. As displayed by the MALDI-TOF mass spectra (data not shown) of the permethylated oligosaccharide, before and after permethylation, saponification and acidic treatment with 2% formic acid in 4:1 acetone-water, no difference is observed. These results lead us to conclude that our strategy used to determine the sialylation extent and the ratio of  $\alpha$ -(2 $\rightarrow$ 3)/ $\alpha$ -(2 $\rightarrow$ 6) sialyl linkages, can also be applied to sulfated and/or fucosylated *N*-glycans. It must be noted that in the case of sulfated oligosaccharides, particular attention must be paid to the end of the methylation procedure as described in [17]. The possible dephosphorylation of phosphorylated oligosaccharides was not checked in these experiments.

*Application to the study of sialylation from bovine fetuin N-glycans.* -After releasing of fetuin *N*-glycan chains by hydrazinolysis (see experimental section), the absence of sialylated

**Table 1:** Quantification of 3-Et-Gal and 6-Et-Gal derivatives generated from synthetic mixture of LSTa and LSTc in respective proportion 2/1, 1/1 and 1/2.

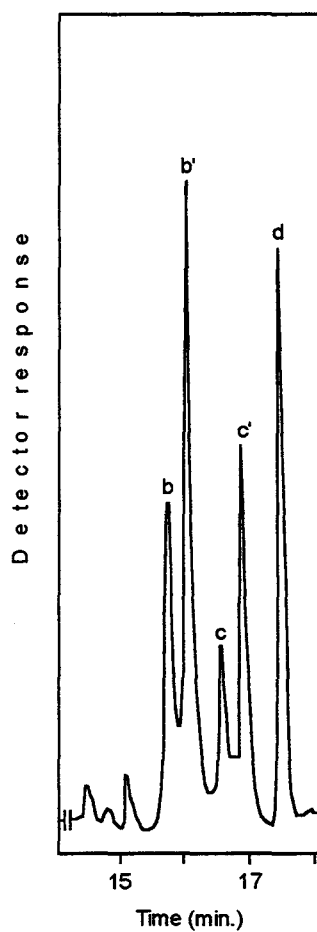
Ratio LSTa/LSTc	Derivatives	Areas <sup>a</sup>	%	theoretical %
2:1	3-Et-Gal	385.780	60.4	66.6
	6-Et-Gal	253.311	39.6	33.3
1:1	3-Et-Gal	413.051	48	50
	6-Et-Gal	446.680	52	50
1:2	3-Et-Gal	145.803	28.5	33.3
	6-Et-Gal	366.649	71.5	66.6

<sup>a</sup> Areas of 3-Et-Gal and 6-Et-Gal were obtained by summing the areas corresponding to their  $\alpha$  and  $\beta$  anomers.

*O*-glycans was demonstrated by GC analysis of monosaccharides (as their trimethylsilylated derivatives) which did not revealed the presence of GalNAc residues, present in all fetuin *O*-glycans [18]. In the case of polysialylated oligosaccharides containing more than 2 sialic acids per molecule, the solubility in dimethylsulfoxide is very low leading to a poor methylation yield. To overcome this problem, counter-ions ( $\text{Na}^+$  or  $\text{K}^+$ ) of sialic acids must be replaced by triethylammonium ions as described in the experimental section.

*Determination of the level of fetuin glycan chain sialylation.*-Partially methylated and trideuteromethylated methyl galactopyranoside and permethylated galactose generated from the *N*-glycan chains of fetuin were analyzed by GC/CIMS as described for the 2:1 LNT-LSTc mixture. From the respective peak areas ( $A=212,192$ ;  $B=16,354$ ;  $A'=180,015$ ;  $B'=14851$ ), the  $A/(A+B)$  ratio gave 92.8% of sialylation (based on  $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$  ions) and the  $A'/(A'+B')$  ratio gave 92.4% of sialylation (based on  $[\text{M}+\text{H}]^+$  ions). These sialylation levels are in good agreement with the sialylation level of *N*-glycan chains of fetuin (91.6%) as calculated from published data [19].

*Determination of the  $\alpha$ -(2→3) versus  $\alpha$ -(2→6) sialic acid linkages of fetuin N-glycans.*-Following permethylation, saponification and selective desialylation of glycans, the free hydroxyl groups of Gal residues were ethylated before methanolysis. As shown in Fig. 4, the GC analysis of partially methylated and ethylated methyl galactopyranoside indicate that 62% of sialic acids are bound to galactose via an  $\alpha$ -(2→6) linkage whereas 38% are bound via an  $\alpha$ -(2→3) linkage. This proportion differs from earlier results obtained through NMR spectroscopy analysis which gave 50% for each linkage [19]. To check the possibility that another compound could coelute with one of the two peaks of 6-Et-Gal, leading to an increase of the corresponding peak area, quantification of 3-Et-Gal and 6-Et-Gal was carried out by GC/CIMS. According to the peak areas of ions  $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$  at  $m/z$  282 and  $[\text{M}+\text{H}]^+$  at  $m/z$  265, the proportion of sialic acids linked to a Gal residue through an  $\alpha$ -



**Figure 4 :** Gas-phase chromatogram of partially methylated and ethylated monosaccharides generated from bovine fetuin *N*-glycans. Identification of peaks is indicated in Fig. 2.

(2→6) linkage was 64% and 61% respectively (data not shown). These two results confirmed those obtained by GC analysis.

The slight divergence between both results could be explained by the fact that different methods were used. Using the Green *et al.* methodology [19], the proportion of  $\alpha$ -(2→3) and  $\alpha$ -(2→6) sialyl linkages was deduced from HPLC peak areas of different fractions of *N*-glycans which are not always well resolved followed by NMR spectroscopy analysis of these peaks. In our case, whole *N*-glycans are chemically treated at the same time avoiding loss of glycan chains.

### 3. Conclusion

The strategy presented allows the accurate determination of the sialylation level of *N*-glycan chains by GC/CIMS analysis of partially methylated and trideuteromethylated methyl galactopyranoside and permethylated galactose. It allows furthermore quantification of sialic acids linked to galactose via an  $\alpha$ -(2→3) or  $\alpha$ -(2→6) linkage by GC analysis of 3-Et-Gal and 6-Et-Gal residues. It relies on the selective labelling of free hydroxyl group of galactose residue obtained after removal of the sialic acids. The saponification is the critical step of our procedure. Indeed, selective desialylation of permethylated glycans is only possible when the carboxyl group of sialic acid remains free.

This methodology presents three advantages : i) all glycan chains are treated at the same time, allowing to a more precise quantification; ii) it constitutes an useful tool for the study of sialylation pattern of glycans since it can be applied to glycans containing *N*-acetyllactosaminic units (bound to the C-3 hydroxyl group of terminal Gal residues), fucose residues and sulfate groups; iii) this strategy could be extended to the study of sialylation of monosaccharides other than galactose (e.g. GalNAc or GlcNAc residues) ( for review [20]).

#### 4. Experimental

*Materials.*-Oligosaccharides, LNT, LSTa and LSTc, were purchased from Oxford Glycosystems (England).

*Release of sialylated N-glycans of fetuin.*-Lyophilised fetuin (2 mg) from fetal calf serum was subjected to hydrazinolysis on a Glycoprep 1000 apparatus (Oxford Glycosystems, England) using the *N*-glycan program. The oligosaccharides were freeze-dried and applied to a Dowex 50WX12 column equilibrated by triethylammonium formate, 1 M, pH 5.0 in order to allow a complete solubilisation of polysialylated oligosaccharides in Me<sub>2</sub>SO during the methylation step. Sialylated oligosaccharides were subsequently eluted by water and lyophilised.

*Methylation.*-Sialylated oligosaccharides were methylated according to the method of Ciucanu and Kereck [21]. The sialylated oligosaccharides (50 µg) were dissolved in Me<sub>2</sub>SO (200 µL) containing NaOH (2 mg) and methyl iodide (100 µL) was added. After sonication for 1 h at room temperature, the reaction mixture was cooled to 0 °C and CHCl<sub>3</sub> (1 mL) was added. The tube was centrifuged at 2000 r.p.m. for 3 min and insoluble compounds (excess of NaOH, NaI) were discarded. The supernatant was first washed with 5% acetic acid and then washed by cooled water (x 9). The CHCl<sub>3</sub> phase was evaporated under N<sub>2</sub> stream and freeze dried.

Two successive methylation cycles were performed for each sample.

*Selective desialylation.*-Permethylated sialylated oligosaccharides were dissolved in EtOH (40 µL) and saponified by a treatment with 0.1 M KOH (200 µL) in 4:1 EtOH-water at 60 °C for 4 h. The reaction mixture was neutralised by adding 2% formic acid (50 µL) in 4:1 acetone-water and immediately dried under N<sub>2</sub> stream. Finally, the same formic acid solution (400 µL) (0.5 M final concentration) were added and the selective desialylation

was carried out overnight at 80 °C. The mixture was divided in two equal portions which were dried under N<sub>2</sub> stream before lyophilisation.

*Deuteromethylation and ethylation procedures.*-The first sample fraction was submitted to deuteromethylation and the second one to ethylation by using MeI-d and EtI respectively. In both cases, the methylation procedure described above was used, except that washing was carried out at room temperature. Two successive alkylation steps (deuteromethylation or ethylation) were carried out for each samples.

*Gas chromatography analysis.*-Partially methylated and trideuteromethylated methyl galactopyranosides and partially methylated and ethylated methyl galactopyranosides were obtained by methanolysis with MeOH-0.5 M HCl at 80 °C for 24 h. At the end of methanolysis, the mixture was concentrated under N<sub>2</sub> stream until just dry. Methylglycosides were acetylated by acetic anhydride (40 µL) in the presence of pyridine (10 µL) at 80 °C for 1 h in the dark. After evaporation under N<sub>2</sub> stream, partially acetylated and trideuteromethylated methyl glycosides were dissolved in CHCl<sub>3</sub> (40 µL) and analyzed by GC/MS by using a DI 700 chromatograph (Delsi France) equipped with a Ross injector and coupled to a Riber Mag 10-10M (France). The column was a DB1 (SGE, 25 m x 0.32 mm). The temperature program used was from 110 °C to 180 °C at the rate of 3 °C / min and from 180 °C to 240 °C at a rate of 5 °C / min. Helium pressure was 0.5 bar. The EI mass spectrum was obtained by using an electron energy of 70 eV , an ionizing current of 0.2 mA and a source temperature of 150 °C. Masses were scanned from 41 to 400 a.m.u. during 1/2 s. For CI/MS analysis, ammonia was introduced into the source at a pressure of 0.1 mm Hg. The source temperature was 100 °C and the masses were scanned from 200 to 400 a.m.u..

The partially acetylated, methylated and ethylated methylglycopyranosides were dissolved in CHCl<sub>3</sub> (1 mL). The CHCl<sub>3</sub> phase was washed with water (x 3) and concentrated under N<sub>2</sub>



stream. GC analysis was subsequently performed by using a GC-14A chromatograph (Shimadzu, Japan). A DB Wax column (30 m x 0.32 mm, JW Scientific INC) was coupled to a DB1 column (25 m x 0.32 mm, SGE) through a glass union (MOGF/005, SGE). The temperature program used was 140 °C → 180 °C (2 °C / min); 180 °C (10 min); 180 °C → 220 °C (4 °C / min); 220 °C (10 min); 220 → 240 °C (6 °C / min). For these three different conditions, separation was monitored by FID.

*MALDI-TOF analysis.*-The molecular mass of the permethylated oligosaccharides was measured by MALDI-TOF on a vision 2000 instrument (Finnigan Mat, Bremen, Germany) equipped with a 337 nm UV laser. The mass spectra were acquired in reflectron mode under a 6 kV accelerating voltage and positive detection. 2,5-Dihydroxybenzoic acid (10 mg/mL) was used as matrix.

---

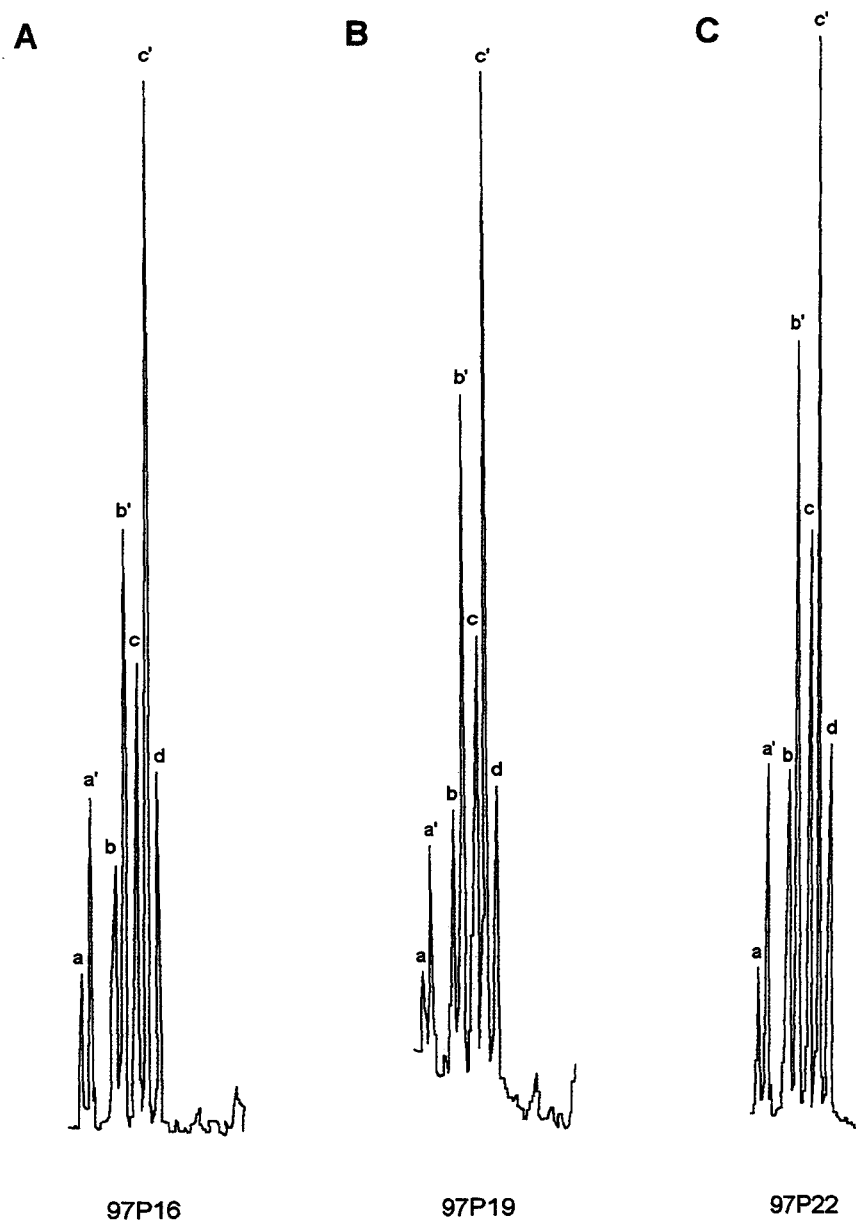
**References**

- [1] G. Reuter and R. Schauer, *Methods Enzymol.*, 230 (1994) 168-200.
- [2] S. Hara, Y. Takemori, M. Yamaguchi, M. Nakamura and, Y. Ohkura, *Anal. Biochem.*, 164 (1987) 138-145.
- [3] K.R. Anumula, *Anal. Biochem.*, 230 (1995) 24-30.
- [4] M. Iwamori, M. Noguchi, T. Yamamoto, M. Yago, and Y. Nagai, *FEBS Lett.*, 233 (1988) 134-138.
- [5] J.C. Paulson, J. Weinstein, L. Dorland, H. van Halbeek, and J.F.G. Vliegthart, *J. Biol. Chem.*, 257 (1982) 12734-12738.
- [6] N. Takahashi, K.B. Lee, H. Nakagawa, Y. Kawamura, Y.T. Li, and Y.C. Lee, *Anal. Chem.*, 230 (1995) 333-342.
- [7] J. Lemoine, G. Strecker, Y. Leroy, and B. Fournet, *Carbohydr. Res.*, 221 (1993) 209-217.
- [8] J.F.G. Vliegthart, H. van Halbeek, and L. Dorland, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 41 (1983) 209-374.
- [9] B. Lindberg, *Methods Enzymol.*, 28 (1972) 178-195.
- [10] C.H. Hokke, A.A. Bergwerff, G.W.K. Van Dedem, J.P. Kamerling, and J.F.G. Vliegthart, *Eur. J. Biochem.*, 228 (1995) 981-1008.
- [11] H. Yoshima, A. Matsumoto, T. Mizuochi, T. Kawasaki, and A. Kobata, *J. Biol. Chem.*, 256 (1981) 8476-8484.
- [12] B. Coddeville, G. Strecker, J.M. Wieruszkeski, J.F.G. Vliegthart, H. van Halbeek, J. Peter-Katalinié, H. Egge, and G. Spik, *Carbohydr. Res.*, 236 (1992) 145-164.
- [13] G. Pfeiffer, M. Schmidt, K-H. Strube, and R. Geyer, *Eur. J. Biochem.*, 186 (1986) 273-286.

- [14] A.K. Powell and D.J. Harvey, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 8 (1996) 1027-1032.
- [15] B. Fournet, G. Strecker, Y. Leroy, and J. Montreuil, *Anal. Biochem.*, 116 (1981) 489-502.
- [16] R. Geyer and H. Geyer, *Methods Enzymol.*, 230 (1994) 86-108.
- [17] J.M. Lo-Guidice, J.M. Wieruszkeski, J. Lemoine, A. Verbert, P. Roussel, and G. Lamblin, *J. Biol. Chem.*, 269 (1994) 18794-18813.
- [18] A.S.B. Edge and R.G. Spiro, *J. Biol. Chem.*, 262 (1987) 16135-1141.
- [19] E.D. Green, G. Adelt, J.U. Baenziger, S. Wilson, and H. van Halbeek, *J. Biol. Chem.*, 263 (1988) 18253-18268.
- [20] A. Harduin-Lepers, M.A. Recchi, and P. Delannoy, *Glycobiology*, 5 (1995) 741-758.
- [21] I. Ciucanu and F. Kerek, *Carbohydr. Res.*, 131 (1984) 209-217.

**ACKNOWLEDGMENTS**

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (UMR N° 111, Relations Structure-Fonction des constituants membranaires, Prof. André VERBERT) and by the Laboratoire Français du Fractionnement et des Biotechnologies, Lille (France). The authors thank Dr. G. Strecker and Dr. J.C. Michalski for the generous gift of the fucosylated and sulfated oligosaccharide and of the bisialylated biantennary *N*-glycan, respectively. The authors thank also Prof. A. Verbert, Dr. A. Harduin-Lepers, Dr. P. Talaga and Mr D. Stokes for their assistance in preparing this paper.



**Figure 1 :** Chromatogrammes en phase gazeuse des dérivés partiellement méthylés et éthylés du galactose obtenus à partir des érythropoïétines humaines recombinantes 97P16 (A), 97P19 (B) et 97P22 (C) (détection par ionisation de flamme). La signification des lettres est indiquée dans la légende de la figure 2 de notre article (page 74).

## 2.1.2. Application aux 3 érythropoïétines 97P16, 97P19 et 97P22

### 2.1.2.1. Détermination du pourcentage de liaisons sialyles $\alpha$ -(2→3) et $\alpha$ -(2→6)

L'étape cruciale de notre stratégie repose sur la désialylation sélective des chaînes glycaniques perméthylées. Elle permet de libérer l'hydroxyl du carbone 3 ou 6 d'un résidu de galactose lié à un acide sialique. Les autres résidus de galactose, engagés dans d'autres types de liaison, en particulier avec le résidu de N-acétylglucosamine d'une répétition N-acétyllactosaminique (liaison  $\beta$ -(1→3)), sont analysés, grâce aux traitements ultérieurs, sous la forme de dérivés partiellement méthylés et acétylés. L'analyse par CPG des résidus de galactose partiellement méthylés et éthylés (3-Et-Gal et 6-Et-Gal) obtenus pour les 3 érythropoïétines humaines recombinantes étudiées a conduit aux chromatogrammes présentés dans la figure 1. Ces trois chromatogrammes révèlent la présence de dérivés 3-Et-Gal et 6-Et-Gal démontrant ainsi que les cellules lymphoblastoïdes humaines utilisées pour la production de ces 3 érythropoïétines humaines recombinantes sont capables de transférer des acides sialiques en  $\alpha$ -(2→3) et en  $\alpha$ -(2→6) sur des résidus de galactose terminaux.

Rappelons que les glycanes de l'érythropoïétine humaine urinaire, considérée comme l'érythropoïétine naturelle, renferment les deux types de liaison sialyle alors que les glycanes des érythropoïétines humaines recombinantes produites à ce jour à partir des différentes cellules de mammifères (CHO, BHK) ne renferment que des acides sialiques liés en  $\alpha$ -(2→3).

Les pourcentages de liaison  $\alpha$ -(2→3) et  $\alpha$ -(2→6) pour les 3 érythropoïétines (tableau 2) révèlent une grande similitude entre les 3 lots et indiquent qu'environ 37% des liaisons sialyles sont de type  $\alpha$ -(2→3) et que 63% sont de type  $\alpha$ -(2→6). La présence de liaison  $\alpha$ -

**Tableau 2 :** Surfaces des pics des dérivés 1-O-méthyl 3-O-éthyl 2,4,6 tri-O-méthyl galactopyrannosides (3-Et-Gal) et 1-O-méthyl 6-O-éthyl 2,3,4 tri-O-méthyl galactopyrannosides (6-Et-Gal) obtenues à partir des 3 érythropoïétines humaines recombinantes 97P16, 97P19 et 97P22.

érythropoïétine humaine recombinante	dérivés galactopyrannosides	surface du pic	pourcentage de liaison $\alpha$ -(2→3)	pourcentage de liaison $\alpha$ -(2→6)
97P16	3-Et-Gal	216.484	37 <sup>a</sup>	63 <sup>b</sup>
	6-Et-Gal	368.280		
97P19	3-Et-Gal	106.350	36,1	63,9
	6-Et-Gal	187.853		
97P22	3-Et-Gal	264.043	37,5	62,5
	6-Et-Gal	439.727		

<sup>a</sup> le taux de liaison  $\alpha$ -(2→3) est obtenu en calculant le rapport :  

$$([3\text{-Et-Gal}] \times 100) / ([3\text{-Et-Gal}] + [6\text{-Et-Gal}])$$

<sup>b</sup> le taux de liaison  $\alpha$ -(2→6) est obtenu en calculant le rapport :  

$$([6\text{-Et-Gal}] \times 100) / ([3\text{-Et-Gal}] + [6\text{-Et-Gal}])$$

(2→6) à un taux aussi important constitue la première originalité structurale de ces 3 érythropoïétines humaines recombinantes. Au regard de ce critère, elles miment beaucoup mieux l'érythropoïétine humaine que les différentes érythropoïétines humaines recombinantes produites à ce jour.

### 2.1.2.2. Détermination du taux de sialylation

La deuxième application de notre stratégie est la détermination du taux de sialylation des chaînes glycaniques. En théorie, sur la base des surfaces de pics correspondant au galactose perméthylé, au 3-Et-Gal et au 6-Et-Gal (tableau 2), le pourcentage de sialylation des chaînes glycaniques pourrait être obtenu en effectuant le calcul suivant :

$$([3\text{-Et-Gal}] + [6\text{-Et-Gal}] \times 100) / ([\text{Gal perméthylé}] + [3\text{-Et-Gal}] + [6\text{-Et-Gal}])$$

Toutefois, une telle méthode de calcul suppose que les dérivés de galactose partiellement méthylés et éthylés aient une réponse identique à celle des dérivés perméthylés lors de leur détection par un détecteur à ionisation de flamme. Pour lever cette incertitude, il nous est apparu plus rigoureux de marquer l'hydroxyl des carbones 3 ou 6 des galactoses, libérés après désialylation sélective, par des groupements deutérométhyls (CD<sub>3</sub>). La séparation par CPG d'un dérivé de galactose perméthylé (Gal-CH<sub>3</sub>) et d'un dérivé de galactose partiellement méthylé et deutérométhylé (Gal-CD<sub>3</sub>) étant impossible, nous avons eu recours à la spectrométrie de masse en mode d'ionisation chimique. En effet, si le comportement chromatographique de ces deux dérivés est identique, la présence d'un groupement deutérométhyl dans un résidu de galactose (Gal-CD<sub>3</sub>) entraîne un déplacement de sa masse de +3 unités qui est facilement perçu par spectrométrie de masse. Cela permet donc de distinguer et de quantifier les deux composés. Ainsi, en effectuant le rapport :

$$([\text{Gal-CD}_3] \times 100) / ([\text{Gal-CD}_3] + [\text{Gal-CH}_3])$$



**Tableau 3 :** Surfaces des pics obtenues par analyse GC/MS en mode chimique (ammoniac) des dérivés de galactose partiellement méthylés et deutérométhylés, caractérisés par les ions A ( $[M+NH_4]^+$  de masse  $m/z$  271) et A' ( $[M+H]^+$  de masse  $m/z$  254) et des dérivés de galactose perméthylés, caractérisés par les ions B ( $[M+NH_4]^+$  de masse  $m/z$  268) et B' ( $[M+H]^+$  de masse  $m/z$  251), obtenus à partir des 3 érythropoïétines humaines recombinantes 97P16, 97P19 et 97P22.

érythropoïétine humaine recombinante	surface des ions A	surface des ions B	pourcentage de sialylation	surface des ions A'	surface des ions B'	pourcentage de sialylation
97P16	1.613.229	365.153	81,5 <sup>a</sup> (82,2) <sup>b</sup>	2.406.467	582.538	80,5 <sup>c</sup>
97P19	424.554	72.061	85,5 (84,5)	633.248	107.373	85,5
97P22	4.863.934	984.275	83 (83,3)	4.878.879	968.069	83,4

<sup>a</sup> le pourcentage de sialylation est obtenu en calculant le rapport :

$$([\text{ions A}] \times 100) / ([\text{ions A}] + [\text{ions B}])$$

<sup>b</sup> Les valeurs entre parenthèses correspondent aux pourcentages de sialylation calculés à partir des surfaces de pics des dérivés de galactose perméthylés, de 3-Et-Gal et de 6-Et-Gal obtenues par analyse CPG (tableau 2).

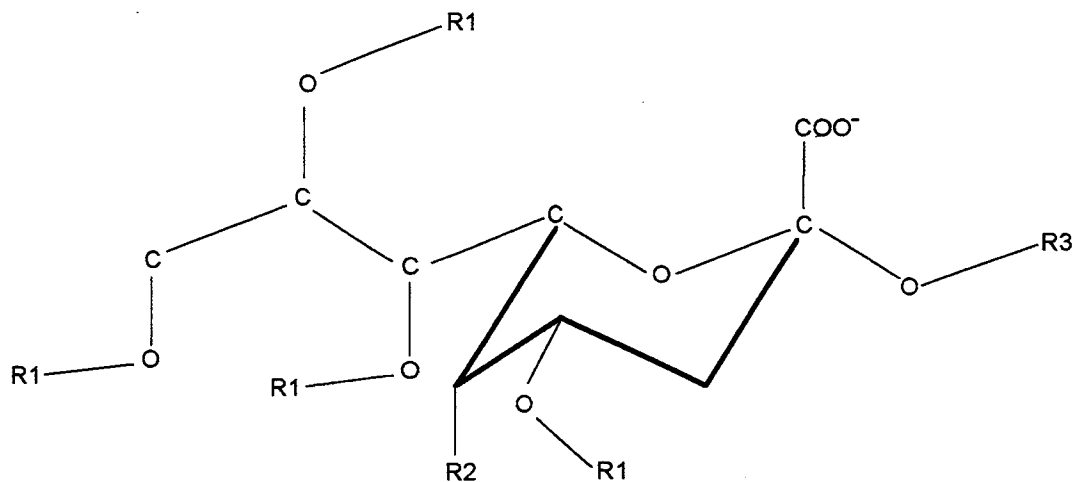
<sup>c</sup> le pourcentage de sialylation est obtenu en calculant le rapport :

$$([\text{ions A}'] \times 100) / ([\text{ions A}'] + [\text{ions B}'])$$

on détermine, de façon rigoureuse, le taux de sialylation.

Comme décrit dans la publication, la surface des ions  $[M+NH_4]^+$  (A) de masse  $m/z$  271 (correspondant à un galactose partiellement méthylé et deuterométhylé) et la surface des ions  $[M+NH_4]^+$  (B) de masse  $m/z$  268 (correspondant à un dérivé de galactose perméthylé) permet d'effectuer le calcul précédent. De même, il est possible d'utiliser les ions  $[M+H]^+$  de masse  $m/z$  254 (A') et 251 (B') pour déterminer le taux de sialylation des glycanes. Les surfaces de pic correspondant à ces différents ions, pour chacune des trois érythropoïétines humaines recombinantes, sont présentées dans le tableau 3. On note, pour chacune de ces trois érythropoïétines, un taux de sialylation très élevé, supérieur à 80%. Quelle que soit la méthode de quantification utilisée (GC/MS ou CPG), les taux de sialylation sont très proches. L'érythropoïétine humaine recombinante 97P19 apparaît la plus sialylée avec un pourcentage moyen de 85,5% suivie de l'érythropoïétine 97P22 avec 83,2% et de l'érythropoïétine 97P16 avec 81%. Toutefois, les écarts de pourcentage de sialylation sont faibles. Si l'on compare ces trois pourcentages de sialylation avec le taux d'acide sialique obtenu par l'analyse de la composition molaire en monosaccharides des trois érythropoïétines humaines recombinantes (environ 80%), on constate une excellente corrélation.

Les taux de sialylation calculés à partir des données issues de l'analyse CPG des dérivés de galactose partiellement méthylés et éthylés (3-Et-Gal et 6-Et-Gal) et de galactose perméthylés sont très proches de ceux obtenus par GC/MS. Cela signifie, d'une part, que les coefficients de réponse des dérivés 3-Et-Gal et 6-Et-Gal apparaissent très voisins et d'autre part, que le simple marquage par éthylation des hydroxyles libres des galactoses après désialylation sélective suffit pour déterminer à la fois le taux de sialylation des chaînes glycaniques et le pourcentage des différentes liaisons sialyles  $\alpha$ -(2→3) et  $\alpha$ -(2→6).



R1 : - H

- acétyl (4,7,8,9)
- lactyl (9) méthyl (8)
- sulfate 8
- anhydro (4,8 ou 2,7)
- phosphate 9
- acide sialique (8,9)
- fucose (4)
- glucose (8)
- galactose (4)

R2 : - N-acétyl

- N-glycolyl
- amino
- hydroxyl

R3 : - galactose (3/4)6

- N-acétylgalactosamine (6)
- N-acétylglucosamine (4/6)
- acide sialique (8/9)

**Figure 2 :** Représentation, en conformation chaise, du squelette carboné commun à tous les acides sialiques.

R1 indique les différentes substitutions des fonctions alcools, R2 celles du carbone 5 et R3 les liaisons glycosidiques dans lesquelles peuvent être engagés les acides sialiques (d'après Varki et Diaz, 1984).

Au cours de ces différentes analyses (CPG et GC/MS), les dérivés partiellement méthylés et acétylés des autres monosaccharides des N-glycannes des 3 érythropoïétines ont été étudiés. Les résultats de ces analyses seront présentés ultérieurement afin d'étayer les différentes structures glycaniques déduites des analyses ES-MS des différents glycopeptides générés à partir des trois érythropoïétines humaines recombinantes.

## **2.2. Analyse qualitative**

### **2.2.1. Principe de la méthode**

Les acides sialiques forment une famille très diverse de composés impliqués dans de nombreuses propriétés biologiques très variées (rôle structural, protection contre les dégradations enzymatiques, (pour revue, A. Varki, 1992)). Ils ont en commun de posséder une fonction carboxylique sur le carbone 1, une fonction cétone sur le carbone 2 (l'ensemble formant ainsi un groupement  $\alpha$ -céto-carboxylique sur lequel nous allons revenir), une fonction amine ou hydroxyl sur le carbone 5 et des fonctions alcools sur les carbones 4, 6, 7, 8 et 9. La très grande diversité des acides sialiques provient de la substitution de ces différentes fonctions. Chez les mammifères, la fonction amine est substituée soit par un groupement acétyl (formant la famille des acides N-acétylneuraminiques), soit par un groupement N-glycolyl (formant la famille des acides N-glycolylneuraminiques) et les groupements hydroxyls peuvent être substitués par de multiples groupements (fig. 2). Toutes ces modifications ont pour effet de moduler les propriétés biologiques des acides sialiques. Ainsi, l'un des principaux rôles attribués aux groupements acétyls que l'on trouve sur les hydroxyls 4, 7, 8 ou 9 est de protéger les acides sialiques contre l'action des sialidases (Schauer, 1987). Or, dans le cas de l'érythropoïétine, où nous avons vu que leur temps de demi-vie plasmatique dépendait directement du taux de sialylation, de telles

modifications sont importantes à considérer car elles contribuent, en diminuant l'action des sialidases, à augmenter le temps de demi-vie.

De même, la présence d'un groupement acétyl ou N-glycolyl sur la fonction amine du carbone 5 pourra affecter, pour d'autres raisons, la durée de demi-vie de la molécule. En effet, si l'acide N-glycolylneuraminique est retrouvé dans les glycoconjugués humains pendant la période embryonnaire, il disparaît après la naissance. Toutefois, dans certains cancers, cet acide sialique réapparaît dans les glycoconjugués humains et constitue, dans ce cas, un marqueur tumoral grâce à ses propriétés immunogéniques. On comprend dès lors qu'une érythropoïétine humaine recombinante qui renfermerait comme acide sialique l'acide N-glycolylneuraminique stimulerait, chez un individu, la production d'anticorps dirigés contre cet acide sialique provoquant son élimination rapide. De tels anticorps sont connus sous le nom d'anticorps Hanganutziu-Deicher (Mukuria *et al.*, 1986) et sont fréquemment détectés dans le sérum de patients atteints de cancer (Noguchi *et al.*, 1995).

Cela signifie donc, qu'en plus de déterminer le taux de sialylation d'une érythropoïétine humaine recombinante, il convient également de connaître la nature de ses acides sialiques.

Trois étapes successives sont alors nécessaires (Reuter et Schauer, 1994) :

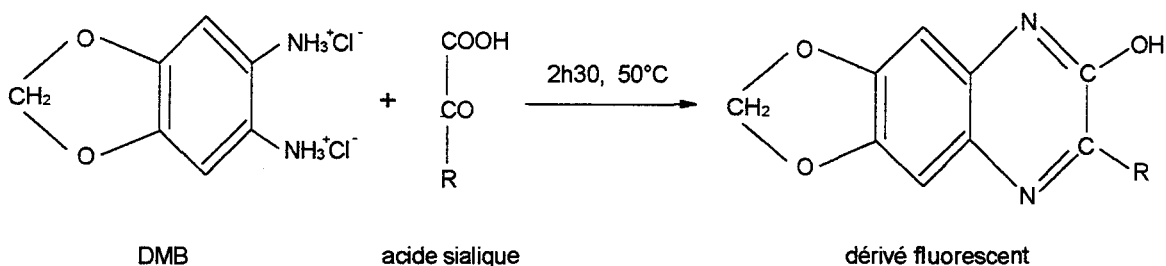
- i) libération quantitative des différents acides sialiques présents dans la glycoprotéine sans les modifier,
- ii) séparation de la glycoprotéine désialylée,
- iii) identification.

Pour la première étape, l'utilisation d'enzymes (les neuraminidases) ne constitue pas la meilleure approche. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, certains acides sialiques acétylés sont résistants à l'action des neuraminidases et leur libération quantitative n'est pas assurée. L'utilisation de solutions acides diluées permet de palier à cet inconvénient. Après avoir testé les différentes conditions opératoires préconisées dans la

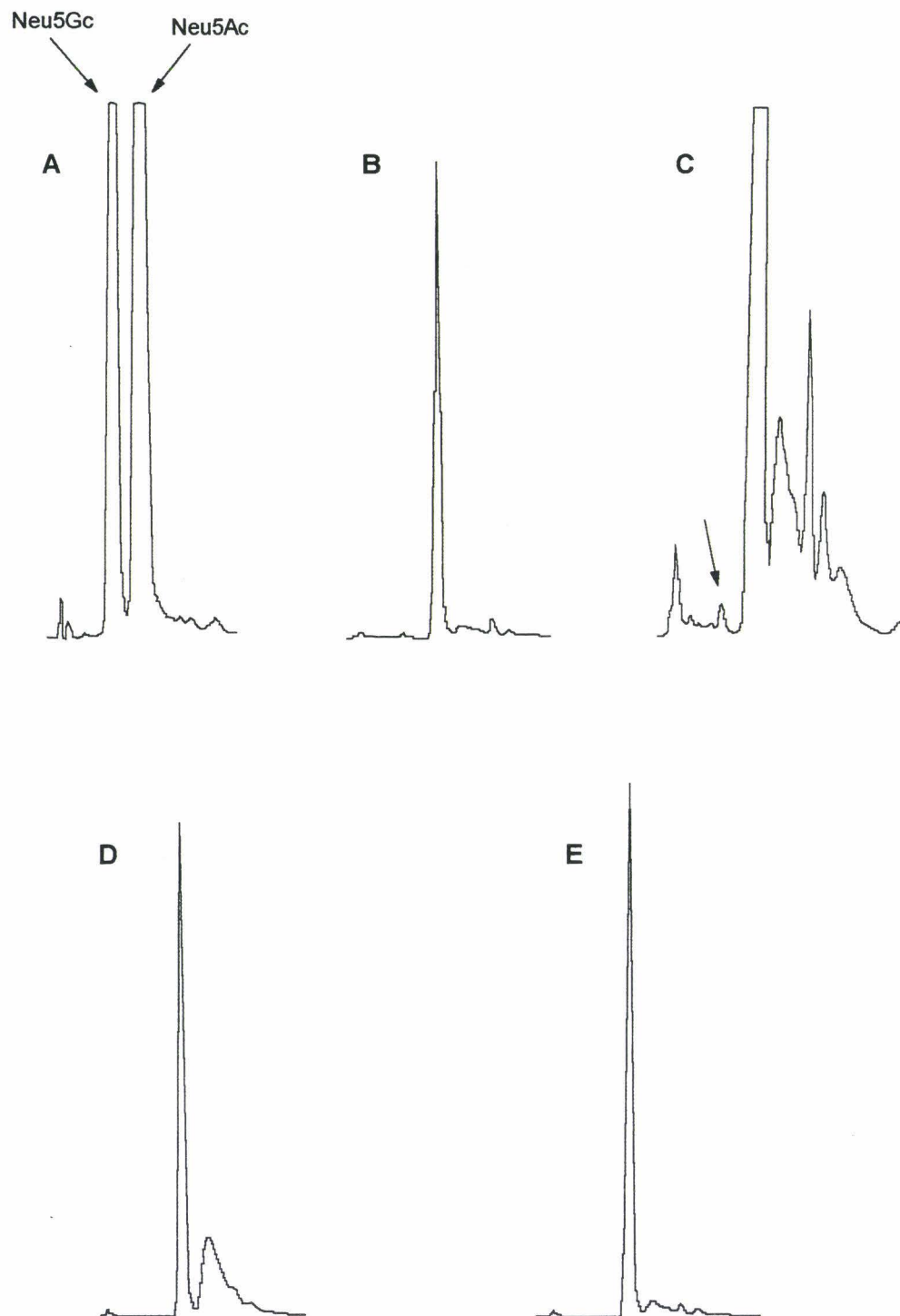
littérature pour libérer les acides sialiques (Reuter et Schauer, 1994), nous avons retenu celui utilisant une solution d'acide acétique 2M à 80°C pendant 3 heures (Varki et Diaz, 1984). Dans nos conditions opératoires, ce traitement nous a permis d'obtenir la plus forte libération des différents acides sialiques présents dans la mucine sous-maxillaire bovine.

Pour la seconde étape, nous avons séparé les acides sialiques du reste des glycoconjugués par dialyse en utilisant des cellules centricon possédant un seuil de coupure de 3000 Da. Comparée à la même technique effectuée dans des boudins de dialyse (type spectrapor), les cellules centricon permettent de récupérer les acides sialiques dans un très faible volume. D'autres techniques ont également été proposées comme la chromatographie de tamisage moléculaire ou encore d'échange d'ions. Concernant cette dernière, le caractère alcalin des résines anioniques utilisées est parfois suffisant pour entraîner la perte de groupements O-acétyls.

L'identification des différents acides sialiques repose sur la méthode de Hara *et al.* (1987) qui utilise le groupement  $\alpha$ -céto-carboxylique commun à tous les acides sialiques pour le marquer grâce au couplage à un dérivé fluorescent di-aminé, qui est le 1,2-di-amino-4,5-méthylènedioxybenzène (DMB), selon la réaction ci-dessous :



Les différents dérivés fluorescents sont ensuite facilement séparés et identifiés par HPLC en phase inversée sur une colonne C18. Un couplage en ligne de la colonne HPLC avec un



**Figure 3 :** Chromatogrammes HPLC correspondant à l'analyse des dérivés DMB de l'acide N-glycolylneuraminique (Neu5Gc) et de l'acide N-acétylneuraminique (Neu5Ac) issus d'un mélange synthétique (A), de l'érythropoïétine humaine recombinante 97P16 à une atténuation de 512 (B) et de 32 (C), de l'érythropoïétine humaine recombinante 97P19 (D) et 97P22 (E) (détection par fluorescence : longueur d'onde d'excitation à 374 nm et longueur d'onde d'émission à 448 nm).

spectromètre de masse ES-MS (Klein *et al.*, 1997) est également réalisable pour confirmer grâce à sa masse moléculaire l'identité d'un acide sialique.

Avant d'effectuer cette étude sur les 3 érythropoïétines humaines recombinantes (97P16, P19, P22), des mises au point préalables ont été réalisées en utilisant une molécule d'érythropoïétine humaine recombinante produite par le LFB dans des conditions très similaires aux 3 érythropoïétines citées ci-dessus.

### 2.2.2. Résultats-discussion

Les 3 chromatogrammes HPLC obtenus pour les 3 érythropoïétines humaines recombinantes ainsi que le chromatogramme correspondant à l'analyse de l'acide N-glycolylneuraminique et N-acétylneuraminique standards sont présentés dans la figure 3. Pour les 3 érythropoïétines humaines recombinantes, le pic majeur correspond au dérivé DMB de l'acide N-acétylneuraminique. Aucun pic n'est observé dans la zone d'élution de l'acide N-glycolylneuraminique. Toutefois, en modifiant les paramètres d'intégration de l'enregistreur, un pic mineur élué à 8 min 39 apparaît sur le chromatogramme correspondant à l'érythropoïétine 97P16 dans la zone d'élution de l'acide N-glycolylneuraminique (Fig. 3c). Un résultat similaire est obtenu pour les deux autres érythropoïétines humaines recombinantes. Le tableau 4 présente les surfaces de pics correspondant aux dérivés DMB des acides sialiques Neu5Gc et Neu5Ac ainsi que leur pourcentage respectif. Dans les trois cas, le pourcentage d'acide Neu5Gc apparaît inférieur à 0,3% du total des acides sialiques détectés. Du reste, l'identification de ce type d'acide sialique ne repose que sur un temps d'élution. Lors de la mise au point de la technique avec une autre érythropoïétine humaine recombinante, nous avons analysé en continu, l'éluat de la colonne par spectrométrie de masse ES-MS selon la technique de Klein *et al.* (1997). Malheureusement, aucun signal n'avait pu être obtenu pour le pic élué dans la zone de l'acide Neu5Gc, vraisemblablement à



**Tableau 4 :** Surface des dérivés DMB de l'acide Neu5Gc et Neu5Ac obtenus à partir des 3 érythropoïétines humaines recombinantes 97P16, 97P19 et 97P22.

érythropoïétine humaine recombinante	surface du pic Neu5Gc	surface du pic Neu5Ac	pourcentage de Neu5Ac	pourcentage de Neu5Gc
97P16	$1,23 \cdot 10^5$	$4,10 \cdot 10^7$	99,7	0,3
97P19	$1,21 \cdot 10^5$	$4,08 \cdot 10^7$	99,7	0,3
97P22	$4,42 \cdot 10^4$	$4,49 \cdot 10^7$	99,9	0,1

cause de la trop faible quantité de cet acide sialique. L'identification de l'acide Neu5Ac avait, quant à elle, été possible grâce à l'apparition, sur le spectre de masse, de ses ions caractéristiques.

Un autre essai visant à co-injecter de l'acide Neu5Gc dérivé au DMB a été effectué en parallèle et une coélution parfaite des deux pics a été observée, ce qui tendrait à confirmer la nature glycolyl de l'acide sialique élué dans cette zone du chromatogramme.

En conclusion, sans pouvoir affirmer que les trois érythropoïétines humaines recombinantes renferment de l'acide Neu5Gc, on peut toutefois dire que son taux est extrêmement faible et que comparée aux données bibliographiques (Hokke *et al.*, 1990 ; Nimitz *et al.*, 1993), ce taux est inférieur à celui de l'érythropoïétine commercialisée et produite dans des cellules CHO.

Si l'on regarde le chromatogramme de la figure 3, d'autres pics, pouvant correspondre à des dérivés O-acétylés, sont observés. Toutefois, une étape préalable de saponification des acides sialiques par un traitement à la soude, suivi de leur dérivation au DMB conduit à un profil chromatographique identique. On peut donc exclure, pour les trois érythropoïétines humaines recombinantes testées, l'absence d'acide sialique O-acétylé. Signalons que de tels acides sialiques ont été mentionnés pour des érythropoïétines humaines recombinantes produites dans des cellules CHO (Rush *et al.*, 1995).

### **3. Etude de la structure des glycanes des 4 sites de glycosylation de chacune des érythropoïétines humaines recombinantes**

La stratégie que nous avons suivie pour réaliser cette étude a consisté à isoler chacun des quatre sites de glycosylation de l'érythropoïétine sous la forme de glycopeptides et de les étudier par spectrométrie de masse ES-MS. Cette stratégie est similaire à celle

suivie par Rush *et al.* (1995) qui ont étudié par ES-MS les différents glycopeptides obtenus après clivage de l'érythropoïétine humaine recombinante non réduite par la trypsine et l'endoprotéinase Glu-C. Deux autres stratégies, radicalement différentes, ont été décrites dans la littérature pour l'étude de la structure des glycannes de l'érythropoïétine. Dans les deux cas, les glycannes ont été libérés par voie chimique ou enzymatique et analysés soit par RMN (Hokke *et al.*, 1995) soit par une méthode cartographique basée sur l'utilisation de différents supports chromatographiques (Tsuda *et al.*, 1988).

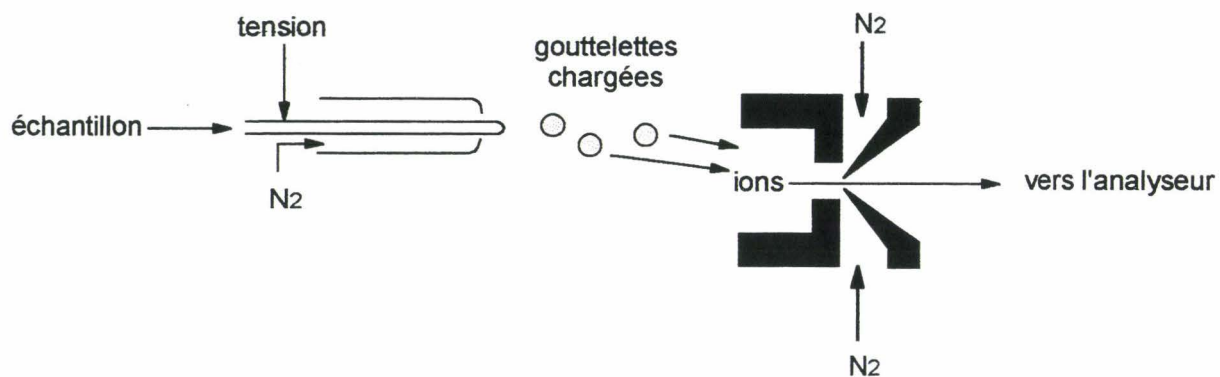
Avant de présenter les résultats que nous avons obtenus, nous allons décrire, succinctement, le principe de fonctionnement d'un spectromètre de masse ES-MS.

### **3.1. Principe de la spectrométrie de masse ES-MS**

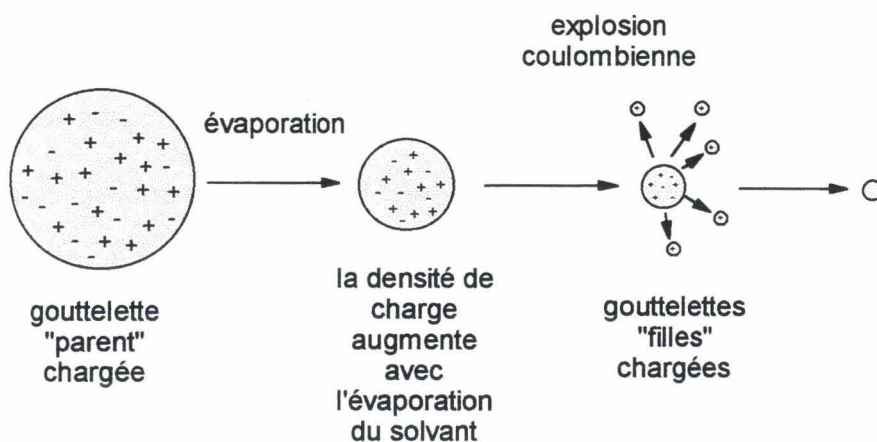
La spectrométrie de masse est une technique qui permet la détermination de la masse moléculaire d'une molécule. Un spectromètre de masse est constitué de 3 éléments : la source, l'analyseur et le détecteur.

Quel que soit le spectromètre de masse utilisé, la première étape de la mesure de la masse moléculaire d'une molécule consiste à former des ions à partir de celle-ci. En fonction de la technique utilisée pour former ces ions, on distingue différentes techniques de spectrométrie de masse. Parmi les plus utilisées en biochimie, nous pouvons citer la FAB-MS (Fast Atom Bombardment-Mass Spectrometry), le MALD-MS (Matrix Assisted Laser Desorption-Mass Spectrometry), la PD-MS (Plasma Desorption-Mass Spectrometry) ou encore l'ES-MS (Electro Spray-Mass Spectrometry). Ayant utilisé cette dernière technique de spectrométrie de masse pour notre étude, nous allons en détailler le principe de fonctionnement.

L'électrospray (électronébulisation) est une technique d'ionisation et de désorption de molécules à partir d'une phase liquide, par application d'un champ électrique élevé sous pression atmosphérique. Concrètement, l'échantillon, dissous dans un solvant contenant un



**Figure 4 :** Schéma d'une source à électronébulisation.



**Figure 5 :** Principe de l'ionisation par électronébulisation.

acide volatil (acide formique par exemple), est injecté dans un capillaire sur lequel est appliquée une tension électrique positive élevée (3500 Volts). Le milieu étant acide, cette haute tension favorise l'apparition d'ions et d'aggrégats moléculaires multichargés  $[M+nH]^{n+}$ .

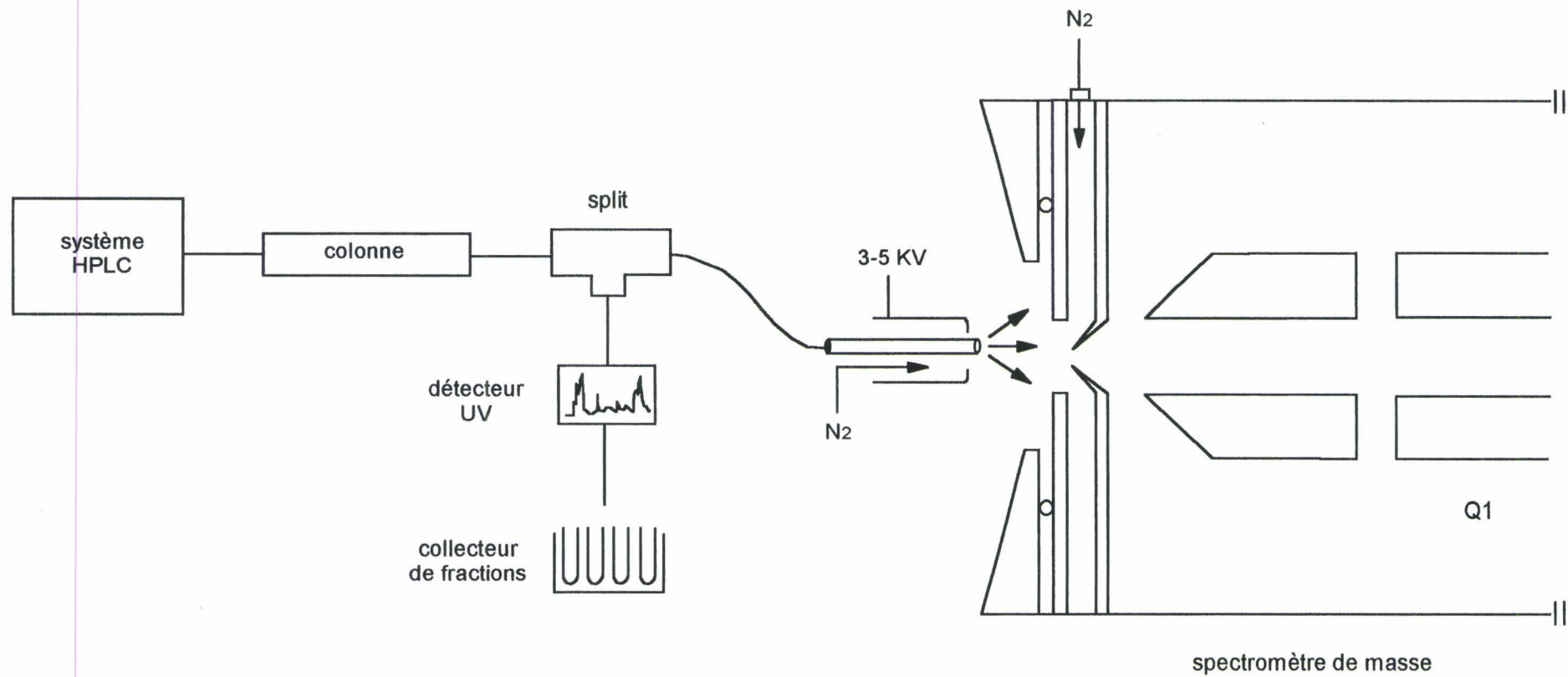
La nébulisation est produite par la différence de potentiel qui existe entre la tension du capillaire (3500 Volts) et une contre électrode reliée à la masse. Cette nébulisation peut être assistée ou non par un flux d'azote coaxial entourant le capillaire (figure 4). Cette différence de potentiel dissipe au sein du nébulisat une grande énergie thermique qui va, avec l'aide du gaz de séchage, diminuer le diamètre des gouttelettes (dites parents) par évaporation du solvant. La densité de charge au sein des gouttelettes va donc augmenter jusqu'à ce que les forces de répulsion coulombiennes entre les ions et aggrégats moléculaires multichargés induisent un éclatement des gouttelettes en microgouttelettes (dites filles) de taille inférieure (explosion coulombienne) (figure 5).

Ces ions et aggrégats multichargés sont ensuite dirigés vers l'analyseur sous l'effet d'un champ électrique. Les ions produits sont positifs, ou négatifs si l'on inverse les polarités du champ électrique appliqué au capillaire.

Tout ce processus d'ionisation/désorption est réalisé dans la source (fig. 4) du spectromètre de masse, dont la pression est voisine de la pression atmosphérique. C'est pourquoi ces sources sont aussi appelées sources API (Atmospheric Pressure Ionisation).

La source est le point crucial du spectromètre de masse : ce n'est qu'en formant une quantité suffisante d'ions multichargés à partir d'une molécule que l'on peut ensuite effectuer l'analyse de ces ions.

L'analyse (ségrégation des ions en fonction de leur rapport  $m/z$ ) est réalisée dans un analyseur quadripolaire constitué de quatre électrodes parallèles cylindriques et de même longueur. Les électrodes diamétralement opposées sont reliées deux à deux. Un potentiel

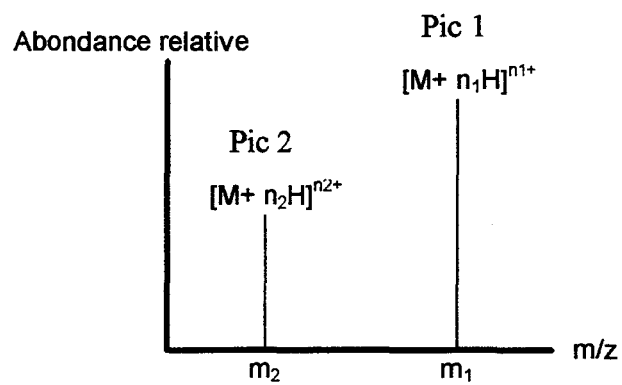


**Figure 6 :** Schéma d'un couplage entre un appareil HPLC et un spectromètre de masse électrospray (LC-MS).

électrique qui se décompose en une tension continue (U) et une tension alternative (V) sinusoïdale de grande fréquence ( $\omega$ ) leur est appliquée. Ainsi, les ions vont prendre un mouvement oscillatoire aussi bien dans l'axe des y que dans celui des z. En faisant varier ces paramètres dans le temps, l'analyseur va séparer les ions selon leur rapport masse / charge ( $m/z$ ) : pour des valeurs données de U et V à un instant t (avec  $\omega$  fixe), seuls les ions ayant le rapport  $m/z$  adéquat pourront traverser le quadripôle et atteindre le détecteur. Les autres ions seront absorbés par les électrodes. Ainsi, en faisant varier U et V et en conservant le rapport U/V constant, on laisse passer successivement à travers le quadripôle des ions ayant des rapports  $m/z$  différents. Ces ions, à la sortie de l'analyseur, vont percuter le détecteur pour générer un faible courant électrique qui sera amplifié et traduit sous la forme d'un pic sur le spectre de masse.

L'électrospray est une méthode puissante d'analyse des macromolécules biologiques (protéines, glycoprotéines, ...). Il existe 2 modes d'introduction de l'échantillon dans la source d'un spectromètre ES-MS. L'introduction directe de l'échantillon à l'aide d'une pompe-seringue (débit de 1 à 10  $\mu\text{l}/\text{min}$ ) définit le mode infusion. Pour cela, l'échantillon doit être suffisamment pur et ne pas renfermer de sels en quantité trop importante. Le second mode d'introduction consiste à coupler la sortie d'une colonne HPLC à l'entrée de la source du spectromètre de masse (fig. 6). Ainsi, au fur et à mesure de leur élution, les molécules sont caractérisées par le temps de rétention et leur masse moléculaire. Ce mode d'introduction permet l'analyse d'une molécule dans un grand état de pureté (en particulier en absence de sels) mais le temps d'analyse, par rapport au mode infusion, est raccourci puisqu'il ne dure que le temps de l'élution de la molécule.

La sensibilité de détection de l'électrospray se situe au niveau de la picomole. La présence d'ions multichargés permet d'augmenter la précision des mesures et offre la possibilité d'analyser des biomolécules de haute masse moléculaire.



**Figure 7 :** spectre modèle montrant deux états de charge ( $+n_1$  et  $+n_2$ ) pour une même molécule de masse moléculaire  $M$  lorsqu'elle est ionisée par protonation en électrospray.



Le spectre ES-MS d'une molécule unique fait apparaître, en général, une série de pics correspondant chacun à un état de charge de la molécule. La masse mesurée correspond à la masse pseudo-moléculaire de la molécule divisée par le nombre de charges positives ou négatives qu'elle porte ( $m/z$ ).

Cela signifie qu'à partir d'un pic unique, on ne peut calculer la masse moléculaire d'une molécule à moins de connaître son état de charge. En revanche, à partir de deux pics de masse  $m/z$  (correspondant à 2 états de charge de la molécule) (Fig. 7), il est possible grâce aux équations ci-dessous, de déterminer la masse moléculaire exacte que l'on appelle également masse moléculaire déconvoluée.

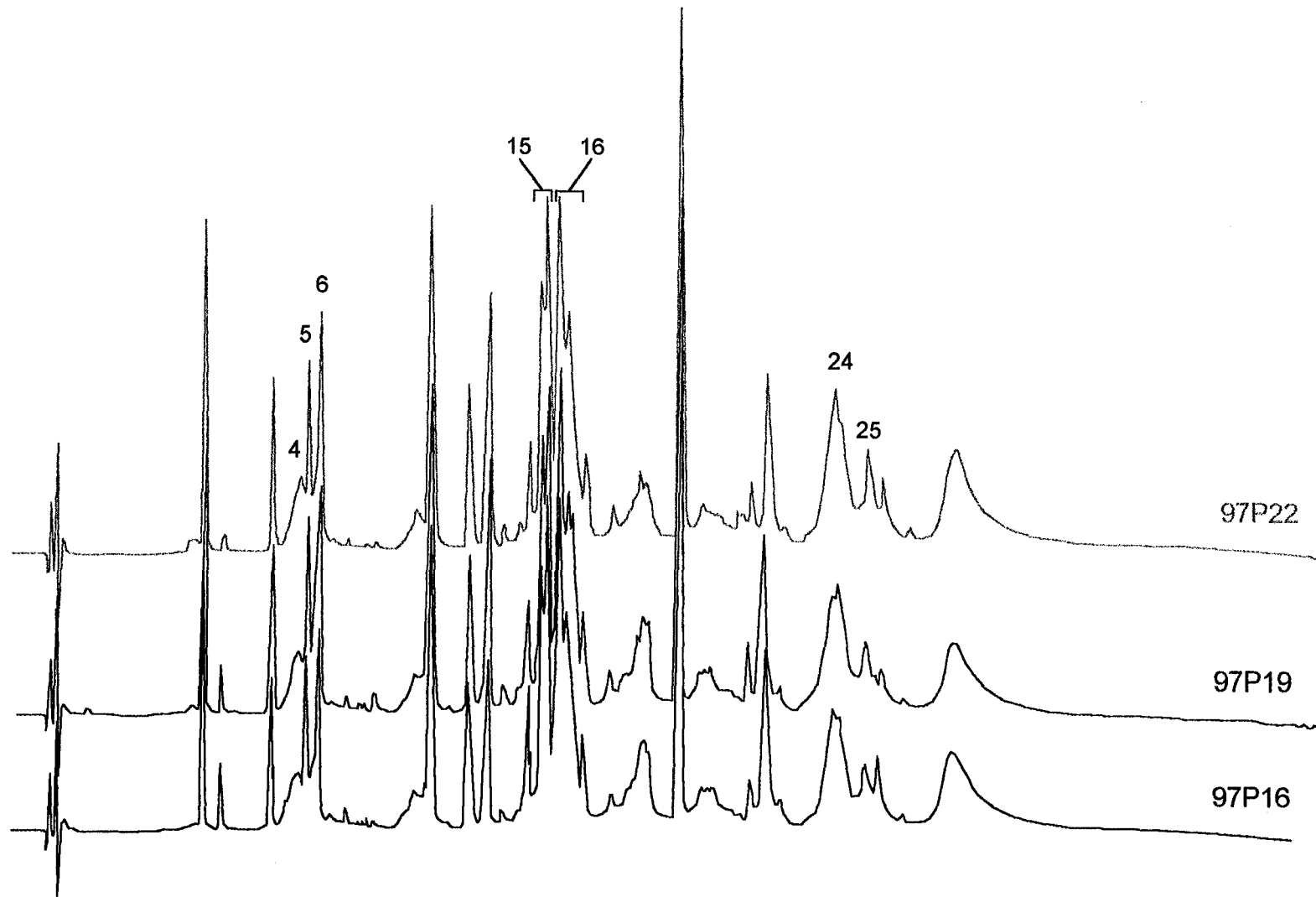
$$m_1 = \frac{M + n_1 X}{n_1} \qquad n_2 = \frac{n_1 - 1}{m_2 - m_1}$$

$$m_2 = \frac{M + n_2 X}{n_2} \qquad M = n_2 \times (m_2 - 1)$$

avec  $m_1$  = masse du pic 1  
 $m_2$  = masse du pic 2  
 $M$  = masse moléculaire (inconnue) de la molécule analysée  
 $n_1$  = état de charge (inconnu) de l'ion moléculaire du pic 1  
 $n_2$  = état de charge (inconnu) de l'ion moléculaire du pic 2  
 $n_2 = n_1 + 1$ , pour deux pics consécutifs  
on pose  $X = 1,0078$  Da (masse atomique du proton).

### 3.2. Analyse HPLC et CE des 3 hydrolysats

Afin de déterminer la structure des différentes chaînes glycaniques présentes sur les 4 sites de glycosylation des 3 érythropoïétines humaines recombinantes 97P16, 97P19 et 97P22, nous avons pratiqué une hydrolyse enzymatique avec l'endoprotéinase Glu-C, qui coupe spécifiquement les liaisons peptidiques Glu-X (X tout acide aminé excepté la proline) du côté C-terminal. Signalons que la digestion enzymatique a été réalisée après avoir réduit et alkylé les cystéines présentes dans la glycoprotéine selon le protocole opératoire décrit dans la rubrique matériels et méthodes. Cette enzyme a été choisie au regard de la structure

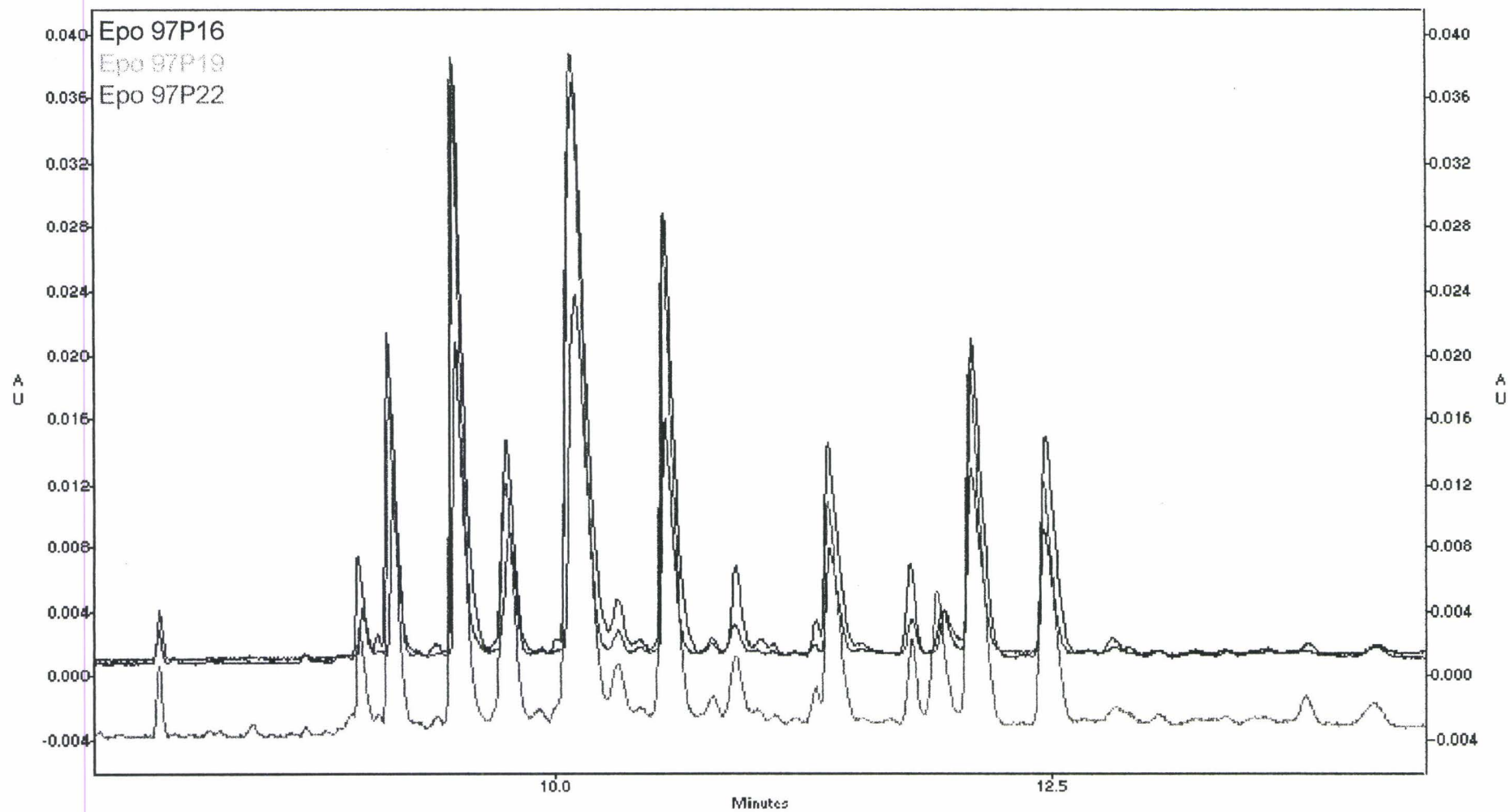


**Figure 8 :** Chromatogrammes de l'hydrolysat enzymatique des 3 érythropoïétines humaines recombinantes analysé par HPLC (détection UV à 214 nm).

primaire de l'érythropoïétine qui révèle que les 3 sites de N-glycosylation (Asn-24, 38 et 83) et le site de O-glycosylation (Ser-126) (figure 3 page 9) sont séparés par au moins un résidu d'acide glutamique. Toutefois, comme le montre la structure primaire, deux résidus d'acide glutamique se trouvent immédiatement liés à un résidu d'asparagine glycosylé. Il s'agit des résidus 23 et 37 qui se trouvent respectivement du côté N-terminal du site de glycosylation Asn-24 et du site Asn-38. La question que nous nous sommes posée a été de savoir si la proximité de glycannes n'allaient pas empêcher (totalement ou partiellement) l'action de l'endoprotéinase Glu-C. Afin de limiter le nombre de coupures possibles pouvant conduire, pour un même site de glycosylation, à plusieurs glycopeptides différents, plusieurs temps d'hydrolyse ont été testés en utilisant une molécule d'érythropoïétine humaine recombinante produite dans des conditions très similaires à celles des 3 érythropoïétines humaines recombinantes 97P16, 97P19 et 97P22. Un temps d'hydrolyse de 8 heures a été retenu car il représente le meilleur compromis entre le rendement d'hydrolyse (estimé par la surface du dernier pic visible sur le chromatogramme et qui correspond à l'érythropoïétine réduite et alkylée) et le nombre de peptides obtenus.

Chacune des 3 érythropoïétines humaines recombinantes a été hydrolysée dans des conditions strictement identiques.

L'analyse des 3 hydrolysats par HPLC en phase inversée sur une colonne C18 (fig. 8) ainsi que par électrophorèse capillaire en mode CZE (fig. 9), ne montre aucune différence que ce soit dans les chromatogrammes ou les électrophorègrammes. Ces résultats laissent présager une très grande similitude de structure entre les 3 érythropoïétines humaines recombinantes. En effet, dans le cas de différences structurales significatives, nous pouvions espérer observer des modifications soit d'ordre qualitatif (présence additionnelle de pic pour l'une des 3 érythropoïétines humaines recombinantes ou absence de pic(s)), soit d'ordre



**Figure 9 :** Electrophorègramme de l'hydrolysat enzymatique des 3 érythropoïétines humaines recombinantes analysé par électrophorèse capillaire (détection UV à 206 nm).

quantitatif (surface de pic augmentée ou diminuée), notamment sur les électrophorogrammes. Or, aucune différence, aussi minime soit elle, n'est observée.

### 3.3. Identification des différents glycopeptides

Les peptides et glycopeptides obtenus après hydrolyse enzymatique par l'endoprotéinase Glu-C ont été fractionnés par HPLC, collectés puis analysés par MALDI-MS pour repérer parmi les différents pics ceux correspondant aux glycopeptides. Ainsi, 7 pics, les pics 4, 5, 6, 15, 16, 24 et 25 (Fig. 8), ont été identifiés, par MALDI-MS, comme étant des glycopeptides et soumis à la dégradation automatique d'Edman afin de connaître les sites de glycosylation correspondants. Les pics 4, 5 et 6 ont conduit à la séquence en acides aminés présentée ci-dessous :

${}_{(H)}$ Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu<sub>(OH)</sub> (zone 22-31 de la protéine).

La masse moléculaire théorique de ce peptide est de 1112,20 Da, en tenant compte que la cystéine est sous la forme d'éthyl pyridyl cystéine après alkylation avec la 4-vinylpyridine. Ces résultats démontrent l'appartenance de ces pics au site de glycosylation Asn-24.

Le séquençage des glycopeptides des pics 15 et 16 a montré qu'ils correspondaient à la zone 32-55 de la protéine ( ${}_{(H)}$ His Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu<sub>(OH)</sub>), qui renferme le site de glycosylation Asn-38. La masse moléculaire calculée d'après cette séquence est de 3000,43 Da.

Enfin, concernant le dernier site de N-glycosylation localisé sur l'Asn-83, il a été repéré dans le pic 24. La structure primaire établie pour les glycopeptides est la suivante :

${}_{(H)}$ Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu<sub>(OH)</sub> et correspond à la zone 73-117 de la protéine. La masse moléculaire théorique de ce peptide est de 4865,63 Da.

Quant au site de O-glycosylation (Ser-126), la séquence en acides aminés du glycopeptide (pic 25) est :

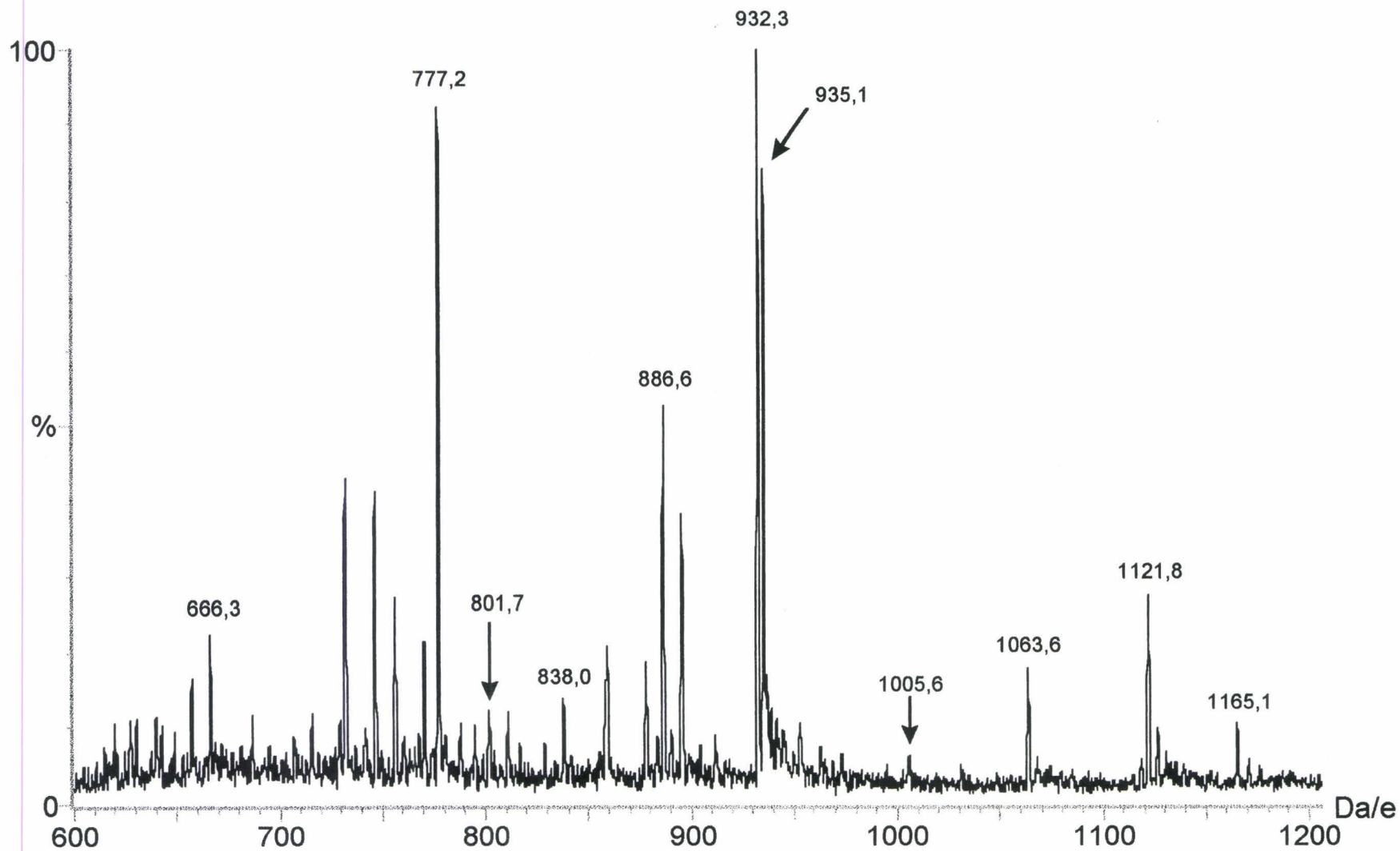
<sup>(H)</sup>Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu<sub>(OH)</sub> (zone 118 à 159 de l'érythropoïétine) et possède une masse moléculaire de 4657,37 Da.

### **3.4. Analyse des glycopeptides des trois érythropoïétines humaines recombinantes par ES-MS**

#### **3.4.1. Enoncé de la méthode de déduction des structures glycaniques**

Après avoir repéré et identifié les glycopeptides correspondant aux quatre sites de glycosylation, leur étude par spectrométrie de masse en mode électrospray a été entreprise afin de déduire la structure des différentes chaînes glycaniques présentes sur ces glycopeptides. Le principe est le suivant :

Après avoir attribué l'état de charge aux différents ions observés sur le spectre de masse, la masse moléculaire déconvoluée a pu être calculée. Ainsi, la masse moléculaire du glycanne a été obtenue en effectuant la différence entre la masse moléculaire du glycopeptide et celle de son squelette peptidique (d'après les données de séquençage). En se basant d'une part, sur la masse moléculaire des différents monosaccharides et d'autre part, sur les données bibliographiques concernant la structure des glycanes de l'érythropoïétine humaine urinaire, nous en avons déduit la structure brute du glycanne correspondant. Toutefois, cette méthode ne permet pas de faire la différence entre les différents isomères possibles d'un glycanne. En effet, une structure tétraantennée donnera le même spectre de masse qu'une structure triantennée possédant une répétition N-acétyllactosaminique, car elles possèdent toutes les deux la même masse moléculaire.



**Figure 10 :** Spectre de masse correspondant aux peptides et glycopeptides du site de glycosylation Ser-126 de l'érythropoïétine humaine recombinante 97P19 obtenu par ES-MS.

Deux modes d'analyse par ES-MS (mode infusion et couplage LC-MS) ont été utilisés pour l'analyse des glycopeptides. Les O-glycopeptides ont été analysés en mode infusion alors que les sites de N-glycosylation l'ont été grâce au couplage (LC-MS). En effet, l'analyse en mode infusion de ces derniers ne nous a pas donné des spectres de masse interprétables dû vraisemblablement à la présence de sels, même à l'état de trace, et à la grande hétérogénéité des N-glycannes. Le pourcentage respectif de chacune des espèces moléculaires a été établi d'après leur intensité relative sur le spectre. Toutefois, il convient de souligner que la quantification de molécules par spectrométrie de masse n'est qu'approximative et peut s'avérer, dans certains cas, complètement erronée. En effet, à cause des phénomènes dit de « suppression », une molécule présente en faible quantité dans un mélange peut être détectée sous la forme d'un pic très intense alors qu'une molécule présente en quantité très supérieure le sera sous la forme d'un pic mineur. Ce phénomène de « suppression » dépend d'un grand nombre de facteurs, en particulier, de la facilité qu'a ou non la molécule à s'ioniser. Toutefois, étant donné que les glycopeptides présents dans chacune des fractions analysées possèdent le même squelette peptidique et que les structures glycaniques sont très proches les unes des autres, on peut penser que ce phénomène de « suppression » ne s'applique pas ou peu dans notre cas. Aussi, une quantification relativement précise des différentes espèces moléculaires en mélange peut être obtenue.



### **3.4.2. Etude du site Ser-126 des trois lots d'érythropoïétine**

Les O-glycopeptides ont été étudiés en mode infusion sous leur forme native et désialylée. Dans les trois cas, les spectres de masse (figure 10, annexes 1 et 2) correspondant à la forme native des glycopeptides, indiquent la présence de quatre ions moléculaires (tableau 5) :



**Tableau 5 :** Masses et états de charge des quatre ions moléculaires obtenus lors de l'analyse ES-MS du site de glycosylation Ser-126 des 3 érythropoïétines humaines recombinantes 97P16, 97P19 et 97P22. La masse du peptide est de 4657,4 Da.

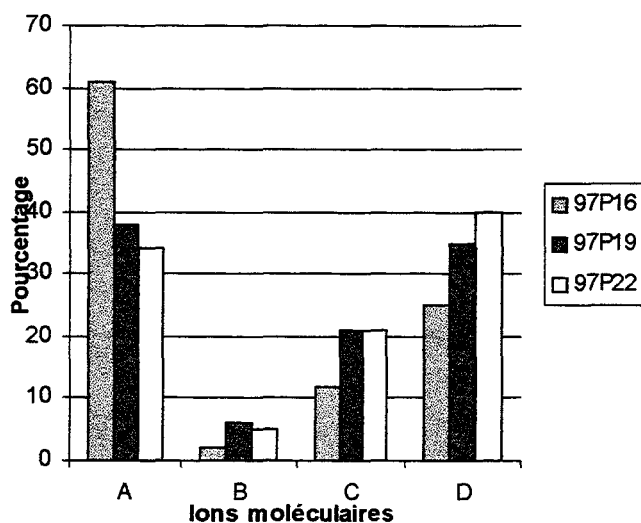
Ion moléculaire	état de charge	97P16		97P19		97P22		masse théorique
		observée	déconvoluée	observée	déconvoluée	observée	déconvoluée	
A	+4	1165,0	4656,0	1165,1	4656,4	1165,2	4656,8	4657,4
	+5	932,1	4655,5	932,3	4656,5	932,3	4656,5	
	+6	777,0	4656,0	777,2	4657,2	777,2	4657,2	
	+7	666,2	4656,4	666,3	4657,1	666,3	4657,1	
B	+5			1005,6	5023,0	1005,5	5022,5	5022,7
	+6	837,9	5021,4	838,0	5022,0	838,0	5022,0	
C	+5	1063,4	5312,0	1063,6	5313,0	1063,6	5313,0	5313,9
	+6	886,4	5312,4	886,6	5313,6	886,6	5313,6	
	+7	760,0	5313,0					
D	+4					1401,8		5605,2
	+5	1121,8	5604,0	1121,8	5604,0	1121,9	5604,5	
	+6	934,9	5603,4	935,1	5604,6	935,1	5604,6	
	+7	801,6	5604,2	801,7	5604,9	801,8	5605,6	



- l'ion moléculaire A qui d'après sa masse moléculaire (4656,8 Da) correspond au peptide (Ala 118-Glu 159) non glycosylé (MW=4657,4 Da) ;
- l'ion moléculaire B qui correspond au peptide avec un glycanne neutre de type Hex-HexNAc ;
- l'ion moléculaire C qui correspond à la forme monosialylée du glycopeptide précédent ;
- l'ion moléculaire D qui correspond à la forme disialylée du glycopeptide précédent.

Après désialylation chimique, nous avons observé d'une part, la disparition des pics correspondant aux ions moléculaires D (forme disialylée) et C (forme monosialylée) et d'autre part, une intensité relative plus élevée pour l'ion moléculaire A correspondant à la forme neutre du glycopeptide (spectres non montrés) ce qui confirme les structures glycopeptidiques établies.

La sérine en position 126 dans les trois érythropoïétines humaines recombinantes analysées apparaît glycosylée d'une façon identique à celle décrite pour l'érythropoïétine humaine urinaire et les érythropoïétines humaines recombinantes (cellules CHO et BHK). La seule différence observée dans la comparaison des érythropoïétines humaines recombinantes analysées concerne la proportion des différents ions moléculaires décrits ci-dessus. En effet, comme le montre l'histogramme ci-après, le site Ser-126 du lot 97P16 apparaît beaucoup moins glycosylé que dans les deux autres lots.



Une telle observation est confirmée par la composition en monosaccharides de cette érythropoïétine humaine recombinante (tableau 1, page 64) qui montre le taux le plus faible en résidus de N-acétylgalactosamine.

On observe de plus, des différences dans les pourcentages des formes monosialylées et disialylées qui apparaissent plus élevées pour les érythropoïétines humaines recombinantes 97P19 et 97P22.

### 3.4.3. Etude des sites de N-glycosylation

#### 3.4.3.1. Généralités

L'érythropoïétine humaine urinaire possède trois sites de N-glycosylation sur les résidus d'Asn 24, 38 et 83.

Comme nous l'avons décrit dans les généralités, les glycanes présents sur ces sites ont comme principales caractéristiques :

- i) de présenter une très grande microhétérogénéité (10 à 15 structures glycaniques différentes)
- ii) d'être fortement antennés (majoritairement tétraantenné)

**Tableau 6 : Nomenclature des structures glycaniques.**

Les structures glycaniques obtenues sont représentées par une lettre et un chiffre (exemple : A6).

La lettre indique le type de structure glycanique (mono-, bi-, tri-, tétra-antennée, etc...) présente sur le glycopeptide.

Le chiffre correspond à la nature de la substitution (Fucose, N-acétylhexosamine intercalaire, sulfate ou phosphate).

Pour une lecture facilitée du rapport, le lecteur est invité à laisser dépliée cette page.

lettre	structure	chiffre	substitution
A		0	+ Fucose
B		1	+ HexNAc
C		2	+ 2 Fucoses
D		3	+ 2 HexNAc
E		4	+ Fucose + HexNAc
F		5	+ 2 Fucoses + HexNAc
G		6	+ Fucose + 2 HexNAc
H		7	+ Fucose + Sulfate ou Phosphate
I		8	+ Fucose + HexNAc + Sulfate ou Phosphate
J		9	+ 2 Fucoses + HexNAc + Sulfate ou Phosphate

pep : correspond à la copule peptidique du glycopeptide

**Veillez déplier la feuille pour  
faire apparaître le tableau 6,  
merci.**

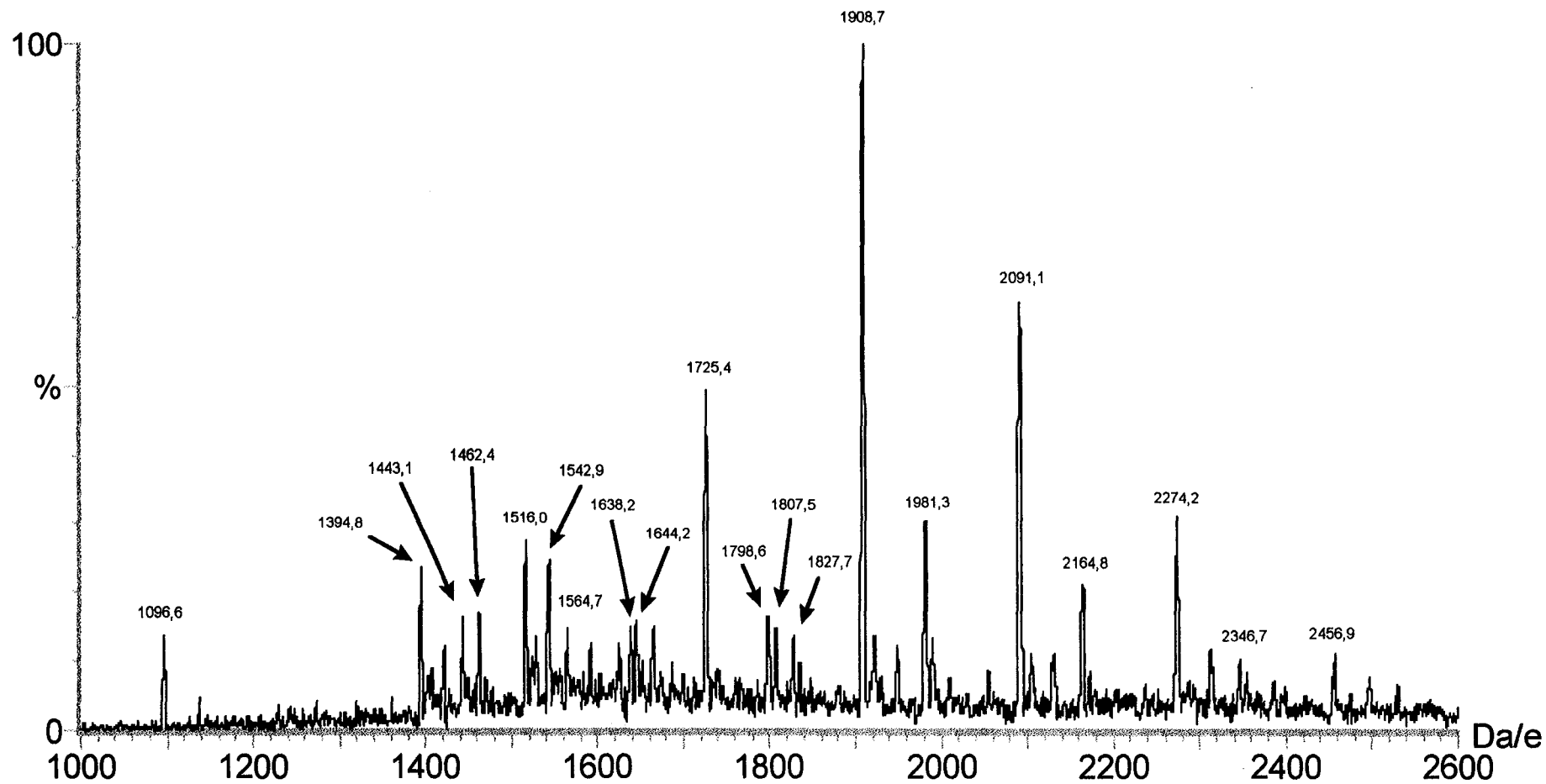
- iii) d'être fortement sialylés
- iv) de posséder des répétitions N-acétyllactosaminiques (2 au maximum)
- v) de posséder un résidu de fucose.

L'étude par ES-MS des glycopeptides sialylés n'a pas conduit à des spectres de masse interprétables. Afin de réduire le nombre de pics par spectre de masse, cette étude a été entreprise après désialylation chimique des glycopeptides. Ainsi, des spectres de masse simplifiés ont pu être interprétés en terme de structures glycaniques.

Compte tenu du grand nombre de structures glycaniques présentes par site, nous avons adopté, dans un souci de clarté, la nomenclature présentée dans le tableau 6 (tableau 6 visible après dépliage de la feuille A3). Cette présentation permet au lecteur une consultation instantanée de celle-ci pour une compréhension optimale des résultats obtenus par spectrométrie de masse.

Chaque glycanne est identifié par une lettre suivie d'un chiffre. La lettre indique le type de structure glycanique (mono-, bi-, tri-, tétra-antenné) et le chiffre correspond à la nature de la substitution (fuc, HexNAc intercalaire, sulfate ou phosphate).

Après avoir présenté les différents spectres de masse obtenus pour chacun des sites de l'érythropoïétine humaine recombinante 97P19, les structures glycaniques déduites seront répertoriées dans un tableau qui regroupera également la masse  $m/z$  des différents ions observés (classés par ordre croissant), leur état de charge, la masse moléculaire déconvoluée correspondante, la masse moléculaire théorique de structures glycaniques déduites et leur pourcentage respectif. Afin d'avoir la meilleure vision possible du profil de glycosylation du site étudié, le pourcentage des différentes structures glycaniques déduites (identifiées d'après la nomenclature du tableau 6) sera également présenté dans un histogramme. Pour les deux autres érythropoïétines humaines recombinantes 97P16 et 97P22, les mêmes figures, tableaux et histogrammes seront présentés en annexe.



**Figure 11 :** Spectre de masse correspondant aux N-glycopeptides désialylés du pic 4 du site de glycosylation Asn-24 de l'érythropoïétine humaine recombinante 97P19 obtenu par LC-MS.

A l'issue de l'étude exhaustive de chacun des 3 sites de glycosylation de l'érythropoïétine 97P19, une comparaison avec les sites équivalents, issus des deux autres érythropoïétines, sera faite à l'aide d'un histogramme qui reprendra l'ensemble des structures déduites et leur pourcentage respectif.

#### **3.4.3.2. Analyse du site de glycosylation Asn-24 désialylé**

Le séquençage complet de tous les peptides et glycopeptides obtenus après hydrolyse de la protéine par l'endoprotéinase Gluc-C a révélé que les glycopeptides correspondant au site de glycosylation Asn24 étaient élués, dans nos conditions, sous la forme de trois pics différents (numérotés 4, 5 et 6 sur le chromatogramme de la figure 8 page 96). Ces trois pics ont été collectés séparément et étudiés par spectrométrie de masse en mode LC-MS.

##### **3.4.3.2.1. Analyse du pic 4 du site de glycosylation Asn-24 de l'érythropoïétine humaine recombinante 97P19**

Le spectre de masse présenté dans la figure 11 révèle la présence de nombreux ions moléculaires de masse  $m/z$  comprise entre 1096,6 et 2456,9 u.m.a.. Les différentes structures glycaniques déduites sont présentées dans le tableau 7. L'histogramme ci-après présente le pourcentage respectif des glycannes identifiés dans le pic 4 du site Asn-24.

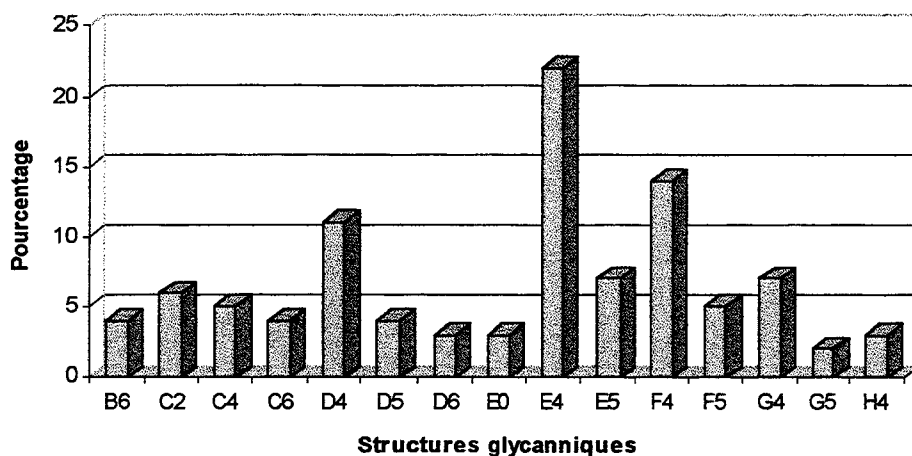


**Tableau 7 :** Structures glycaniques déduites d'après les ions de masse  $m/z$  observés sur le spectre de masse (Fig. 11) correspondant au pic 4 du site de glycosylation Asn-24 de l'érythropoïétine humaine recombinante 97P19.

masse observée	état de charge	masse déconvoluée	structure glycanique déduite	masse théorique	pourcentage
1462,4	+2	2922,8	B6 <sup>a</sup>	2922,9 <sup>b</sup>	4
1516,0	+2	3030,0	C2	3028,0	6
1542,9	+2	3083,8	C4	3085,0	5
1644,2	+2	3286,6	C6	3288,2	4
1096,6	+3				
1725,4	+2	3448,8	D4	3450,4	11
1798,6	+2	3595,2	D5	3596,5	4
1827,7	+2	3653,4	D6	3653,6	3
1807,5	+2	3613,0	E0	3612,5	3
1908,7	+2	3815,6	E4	3815,7	22
1272,9	+3				
1981,3	+2	3960,6	E5	3961,8	7
2091,1	+2	4180,8	F4	4181,0	14
1394,8	+3				
2164,8	+2	4327,0	F5	4327,2	5
1443,1	+3				
2274,2	+2	4545,7	G4	4546,4	7
1516,0	+3				
2346,7	+2	4691,3	G5	4692,5	2
1564,7	+3				
2456,9	+2	4911,7	H4	4911,7	3
1638,2	+3				

<sup>a</sup> d'après la nomenclature du tableau 6.

<sup>b</sup> la masse théorique du glycopeptide a été obtenue en ajoutant à la masse théorique du peptide (1112,2 Da) celle du glycanne et en retranchant la masse correspondant à l'élimination d'une molécule d'eau.



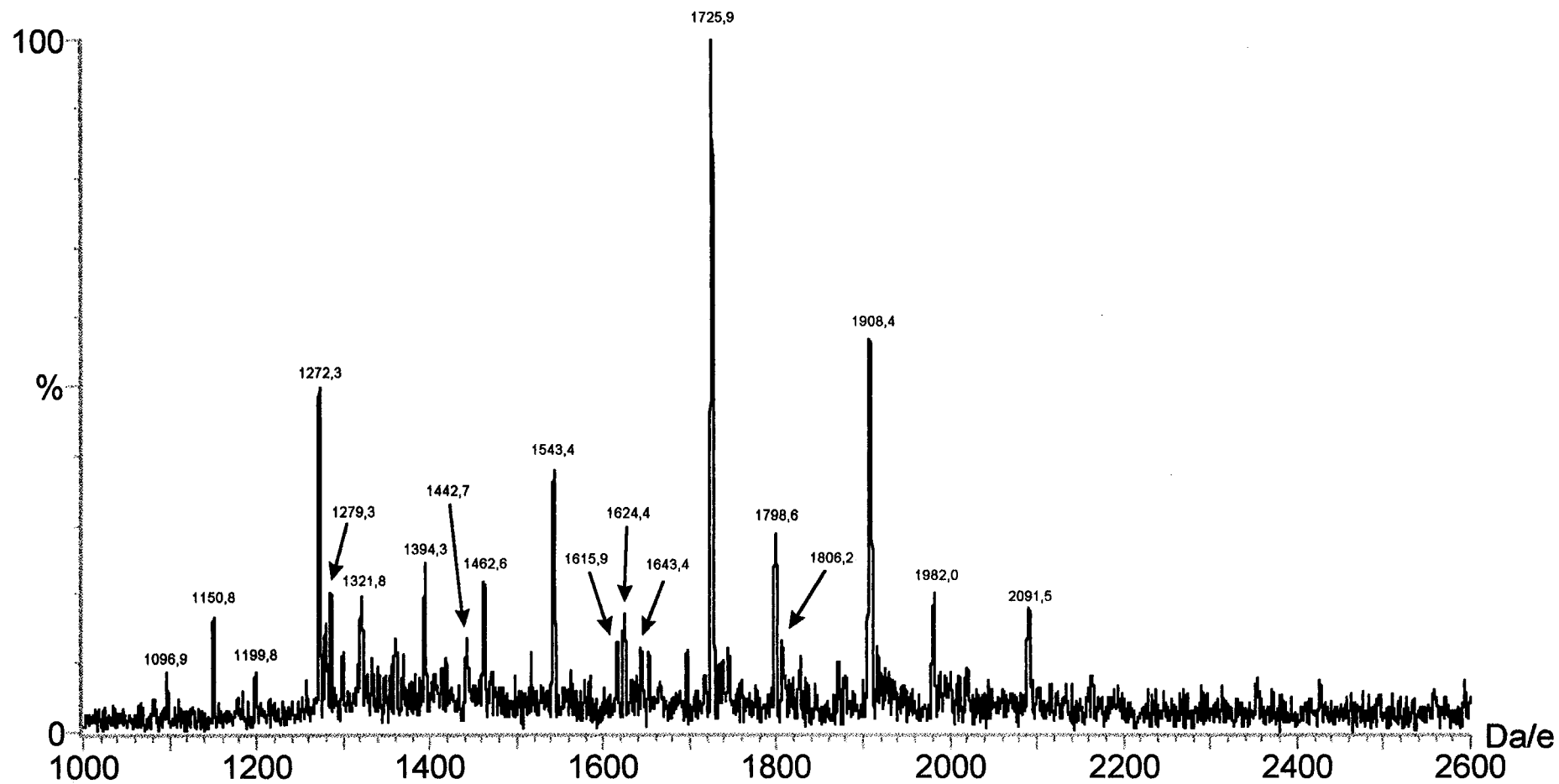
On note dans cette fraction la présence de structures mono, bi, tri et tétraantennées avec pour certaines, la présence de un ou deux résidus de fucose, d'un résidu de N-acétylhexosamine supplémentaire, ainsi que des répétitions N-acétyllactosaminiques dont le nombre varie de 1 à 3.

Si l'on fait abstraction des différentes structures glycaniques pouvant être déduites à partir d'une même masse moléculaire (ex : une structure tétraantennée possède une masse moléculaire identique à celle d'une structure triantennée possédant une répétition N-acétyllactosaminique), le glycanne majeur (E4, 22%) correspond à une structure de type tétraantenné avec un résidu de fucose et un résidu de N-acétylhexosamine.

Les structures glycaniques les plus représentées, après le glycanne E4, correspondent à des structures complexes de type tétraantenné avec une N-acétylhexosamine supplémentaire, 1 ou 2 résidu(s) de fucose et avec 0 à 2 répétition(s) N-acétyllactosaminique(s) (glycannes F4 (14%), G4 (7%), E5 (7%) et F5 (5%)) et d'autre part, à des structures complexes de type triantenné et biantenné avec ou sans N-acétylhexosamine intercalaire et avec 1 ou 2 résidu(s) de fucose (glycannes D4 (11%), C2 (6%) et C4 (5%)).

D'une façon générale, la majorité des structures glycaniques décrites sont de type tétraantenné (de E0 à H4) et représente 63%, alors que 18% sont de type triantenné (D4 à D6), 15% de type biantenné (C2 à C6) et 4% de type monoantenné (B6).

Un tiers des structures décrites de type tétraantenné possèdent une ou plusieurs répétition(s) N-acétyllactosaminique(s). Pour les raisons évoquées ci-dessus, il est vraisemblable que certaines structures triantennées possèdent également des répétitions N-acétyllactosaminiques comme cela a été démontré par Hokke *et al.* (1995) à propos d'une érythropoïétine humaine recombinante produite dans des cellules CHO. Une proportion importante de glycanes (27%) sont difucosylés. On peut émettre l'hypothèse que l'un des 2 résidus de fucose est lié à la N-acétylglucosamine du point d'attache par une liaison  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6), comme cela est décrit pour les glycanes fucosylés de mammifères et que le second résidu est fixé au niveau d'un résidu de N-acétylglucosamine d'une antenne ou d'une répétition N-acétyllactosaminique. Dans ce cas, la liaison osidique la plus vraisemblable est une liaison en  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3). La présence d'au moins 2 résidus de fucose pour certains glycanes ainsi que la présence de répétitions N-acétyllactosaminiques est en accord avec les résultats de l'étude de la composition molaire en monosaccharides établie précédemment. En effet, la valeur de 1,24 mole de fucose (sur la base de 3 mannoses) indique que 24% des chaînes glycaniques possèdent 2 fucoses par molécule, ce qui est cohérent avec la valeur de 27% trouvée ci-dessus. L'existence de glycanes difucosylés n'a jamais été décrite pour une érythropoïétine qu'elle soit naturelle (érythropoïétine humaine urinaire) ou recombinante (cellule CHO ou CHK). Cela constitue, après le type de liaisons sialyles  $\alpha$ -(2 $\rightarrow$ 3) et  $\alpha$ -(2 $\rightarrow$ 6), la seconde caractéristique structurale des glycanes des 3 érythropoïétines humaines recombinantes. La présence de 6 résidus de galactose par molécule indique la présence de répétitions N-acétyllactosaminiques puisque, sur la base de structures tétraantennées classiques, nous ne devrions trouver que 4 résidus de galactose. Sans que cela constitue une originalité structurale (puisque de telles répétitions N-acétyllactosaminiques ont été rapportées pour les glycanes des différentes érythropoïétines étudiées, leur nombre apparaît toutefois élevé.



**Figure 12 :** Spectre de masse correspondant aux N-glycopeptides désialylés du pic 5 du site de glycosylation Asn-24 de l'érythropoïétine humaine recombinante 97P19 obtenu par LC-MS.

Enfin, 90% des structures glycaniques de ce pic 4 possèdent un résidu de N-acétylhexosamine supplémentaire. Il est vraisemblable que ce résidu corresponde à une N-acétylhexosamine intercalaire, c'est-à-dire liée par une liaison  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) au mannose central du noyau pentasaccharidique, comme nous l'avons vu dans les généralités. Si la présence de ce résidu de N-acétylglucosamine intercalaire est vérifiée, cela constitue la troisième caractéristique structurale puisque la présence de tel résidu n'a jamais été rapportée auparavant.

Les glycanes D6, C6, et B6, qui représentent 11%, correspondent à des structures avec deux résidus de N-acétylhexosamine supplémentaires. Dans ce cas, on peut penser que ces structures sont issues soit d'un processus de glycosylation incomplet (la galactosyltransférase n'aurait pas agi) soit d'un processus de dégradation partielle des chaînes glycaniques dans le milieu de culture due à des glycosidases.

#### 3.4.3.2.2. Analyse du pic 5 du site de glycosylation Asn-24 de l'érythropoïétine humaine recombinante 97P19

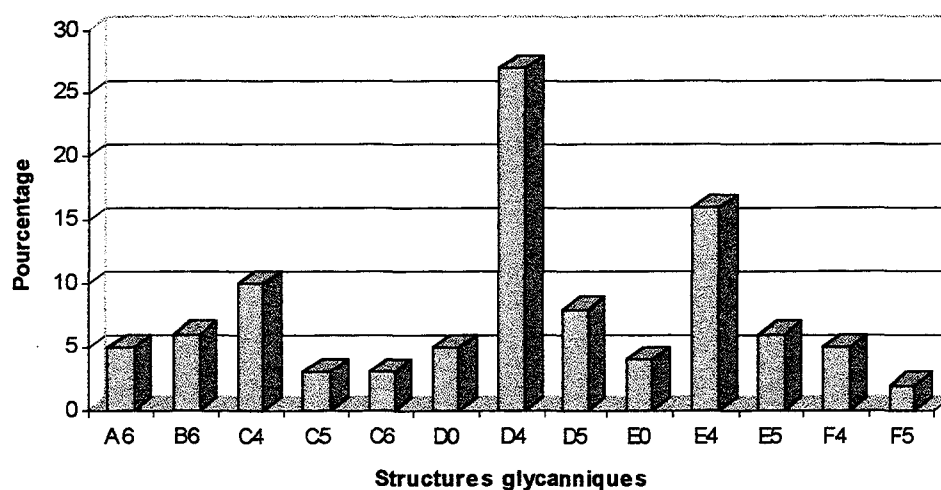
Le spectre de masse présenté dans la figure 12 fait apparaître des ions moléculaires dont la masse  $m/z$  est comprise entre 1096,9 et 2164,4. Les masses moléculaires des différentes structures glycaniques ont été calculées suivant la même méthode que celle appliquée lors de l'étude du pic 4. L'ensemble des résultats est consigné dans le tableau 8 et l'histogramme ci-dessous présente le pourcentage relatif des différents glycanes identifiés dans le pic 5 du site de glycosylation Asn-24.

**Tableau 8** : Structures glycaniques déduites d'après les ions de masse  $m/z$  observés sur le spectre de masse (Fig. 12) correspondant au pic 5 du site de glycosylation Asn-24 de l'érythropoïétine humaine recombinante 97P19.

masse observée	état de charge	masse déconvoluée	structure glycanique déduite	masse théorique	pourcentage
1279,3	+2	2556,6	A6 <sup>a</sup>	2557,5 <sup>b</sup>	5
1462,6	+2	2923,2	B6	2922,9	6
1543,4	+2	3084,8	C4	3085,0	10
1615,9	+2	3229,8	C5	3231,2	3
1643,4	+2	3286,3	C6	3288,2	3
1096,9	+3				
1624,4	+2	3246,8	D0	3247,2	5
1725,9	+2	3449,6	D4	3450,4	27
1150,8	+3				
1798,6	+2	3595,8	D5	3596,5	8
1199,8	+3				
1806,2	+2	3610,4	E0	3612,5	4
1908,4	+2	3814,4	E4	3815,7	16
1272,3	+3				
1982,0	+2	3962,2	E5	3961,8	6
1321,8	+3				
2091,5	+2	4180,5	F4	4181,0	5
1394,3	+3				
2164,4	+2	4326,0	F5	4327,2	2
1442,7	+3				

<sup>a</sup> d'après la nomenclature du tableau 6.

<sup>b</sup> la masse théorique du glycopeptide a été obtenue en ajoutant à la masse théorique du peptide (1112,2 Da) celle du glycanne et en retranchant la masse correspondant à l'élimination d'une molécule d'eau.



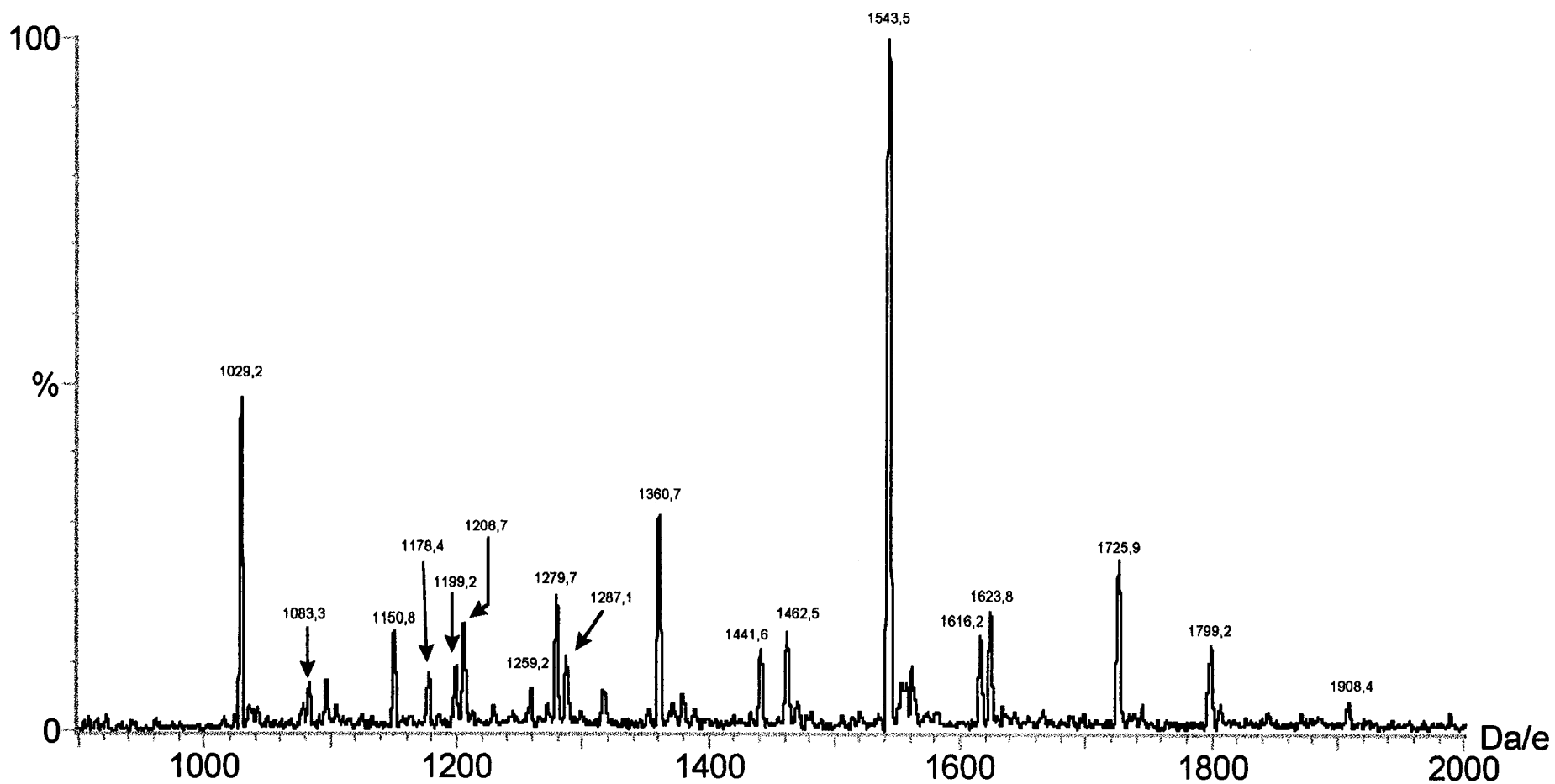
L'histogramme présenté ci-dessus montre, comme précédemment, la présence de structures glycaniques mono, bi, tri et tétraantennées avec, pour certaines d'entre elles, la présence de un ou deux résidu(s) de fucose, d'un résidu de N-acétylhexosamine supplémentaire ainsi que des répétitions N-acétyllactosaminiques (de 1 à 2).

La structure majoritaire (D4, 27%) est de type triantenné monofucosylé avec 1 résidu de N-acétylhexosamine supplémentaire.

Cette fraction contient des structures tétraantennées (33%), triantennée (40%), biantennée (16%) et monoantennée (6%). Par rapport au pic 4, la proportion de structure tétraantennée a considérablement baissé (de 63 à 33%), alors que le taux de structure triantennée a augmenté (de 18 à 40%). Il apparaît donc que les structures glycaniques présentes dans le pic 5 du site de glycosylation Asn-24 sont moins antennées que celles du pic 4.

Les autres structures présentes dans des proportions relativement importantes correspondent aux glycanes E4 (16%), C4 (10%) et D5 (8%).

A l'inverse du pic 4, seules 7% des structures déduites possèdent une répétition N-acétyllactosaminique. De même, le taux de glycanes difucosylés, est inférieur (19% contre 24% dans le pic 4). Au regard des hypothèses émises lors de l'étude de la structure des glycanes des glycopeptides du pic 4 pour la liaison du second résidu de fucose sur un



**Figure 13 :** Spectre de masse correspondant aux N-glycopeptides désialylés du pic 6 du site de glycosylation Asn-24 de l'érythropoïétine humaine recombinante 97P19 obtenu par LC-MS.



résidu de N-acétylglucosamine d'une antenne ou d'une répétition N-acétyllactosamine, ces résultats apparaissent cohérents. En effet, en parallèle de la diminution du nombre d'antennes, on assiste à une diminution du taux de glycanes difucosylés et à une diminution du taux de répétitions N-acétyllactosaminiques.

Par contre, un taux similaire de glycanes possédant un résidu de N-acétylhexosamine supplémentaire (92%) est observé dans le pic 5.

On peut constater, comme pour le pic 4, l'existence de glycanes possédant deux résidus de N-acétylhexosamine excédentaires (B6, C6 et A6) qui rappellent le, pourrait être le reflet d'une action glycosidasique dans le milieu de culture ou d'une sous galactosylation.

Quant au glycanne A6 (absent dans le pic 4), il correspond également à une structure glycanique tronquée qui semble davantage être le fruit d'un processus de dégradation enzymatique dans le milieu de culture que d'un défaut de glycosylation.

#### 3.4.3.2.3. Analyse du pic 6 du site de glycosylation Asn-24 de l'érythropoïétine humaine recombinante 97P19

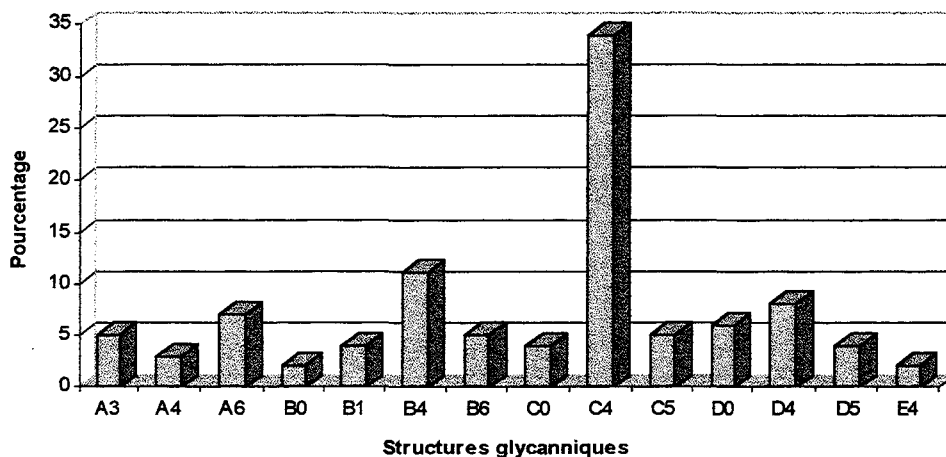
Le spectre de masse présenté dans la figure 13 montre des ions moléculaires dont la masse  $m/z$  est comprise entre 1029,2 et 1908,4 u.m.a.. Les masses moléculaires de chaque structure glycanique ont été calculées de la même façon que pour les pics 4 et 5. Le tableau 9 présente l'ensemble des structures glycaniques déduites et leur pourcentage.

**Tableau 9 :** Structures glycaniques déduites d'après les ions de masse  $m/z$  observés sur le spectre de masse (Fig. 13) correspondant au pic 6 du site de glycosylation Asn-24 de l'érythropoïétine humaine recombinante 97P19.

masse observée	état de charge	masse déconvoluée	structure glycanique déduite	masse théorique	pourcentage
1178,4	+2	2354,8	A4 <sup>a</sup>	2354,4 <sup>b</sup>	3
1206,7	+2	2411,4	A3	2411,4	5
1279,7	+2	2557,4	A6	2557,5	7
1259,2	+2	2516,4	B0	2516,5	2
1287,1	+2	2572,2	B1	2573,5	4
1360,7	+2	2719,4	B4	2719,7	11
1462,5	+2	2923,0	B6	2922,9	5
1441,6	+2	2881,2	C0	2881,8	4
1543,5	+2	3084,8	C4	3085,0	34
1029,2	+3				
1616,2	+2	3230,4	C5	3231,2	5
1623,8	+2	3246,3	D0	3247,2	6
1083,3	+3				
1725,9	+2	3449,6	D4	3450,4	8
1150,8	+3				
1799,2	+2	3595,5	D5	3596,5	4
1199,2	+3				
1908,4	+2	3814,8	E4	3815,7	2

<sup>a</sup> d'après la nomenclature du tableau 6.

<sup>b</sup> la masse théorique du glycopeptide a été obtenue en ajoutant à la masse théorique du peptide (1112,2 Da) celle du glycanne et en retranchant la masse correspondant à l'élimination d'une molécule d'eau.



On note sur l'histogramme ci-dessus, que la proportion de structures tétraantennées (E4, 2%) et triantennées (D0, D4 et D5, 18%) est beaucoup plus faible que celle des fractions 1 et 2. En parallèle, le pourcentage de structures biantennées (C0, C4 et C5, 43%) et de structures monoantennées (B0 à B6, 22%) a augmenté.

La structure majoritaire correspond à l'ion moléculaire C4 qui est une structure biantennée avec un résidu de fucose et un résidu de N-acétylhexosamine intercalaire. Cette structure représente 34% de l'ensemble des structures glycaniques présentes dans cette fraction.

A noter qu'environ 9% des structures glycaniques décrites sont difucosylées (contre 19% pour le pic 5) et qu'aucun glycanne ne possède de répétition N-acétyllactosaminique. Là encore, nous constatons qu'une diminution du nombre d'antennes présentes sur les N-glycannes s'accompagne d'une diminution du taux des glycannes difucosylés.

Par contre, le taux de résidus N-acétylhexosamine intercalaire reste très élevé puisqu'il représente environ 90%.

La proportion de structures glycaniques tronquées est en augmentation (15%) par rapport au pic 5. Les glycannes A6, A3 et A4 proviennent vraisemblablement d'un processus de dégradation dans le milieu de culture.

**Tableau 10 :** Ensemble des structures glycaniques décrites pour le site Asn-24 de l'érythropoïétine humaine recombinante 97P19.

structures glycaniques	structures glycaniques
ou	ou
ou	ou
	ou
	ou
	ou
	ou
	ou
	ou

#### 3.4.3.2.4. Conclusion

Le tableau 10, qui récapitule l'ensemble des structures glycaniques trouvées pour les 3 fractions HPLC du site de glycosylation Asn-24 de l'érythropoïétine humaine recombinante 97P19, montre la très grande hétérogénéité de ce site puisque 24 structures glycaniques différentes sont décrites. Rappelons que cette hétérogénéité ne tient pas compte de celle correspondant aux acides sialiques puisque les glycopeptides ont été étudiés sous leur forme désialylée.

On observe depuis le pic 4 jusqu'au pic 6 une diminution de la masse moléculaire des glycannes présents sur les différents glycopeptides. Ceci est en accord avec leur ordre d'éluion par HPLC. En effet, les glycopeptides possédant les structures glycaniques les plus volumineuses sont aussi les plus hydrophiles et sont par conséquent élués plus rapidement d'une colonne C18.

#### 3.4.3.2.5. Cas des érythropoïétines 97P16 et 97P22

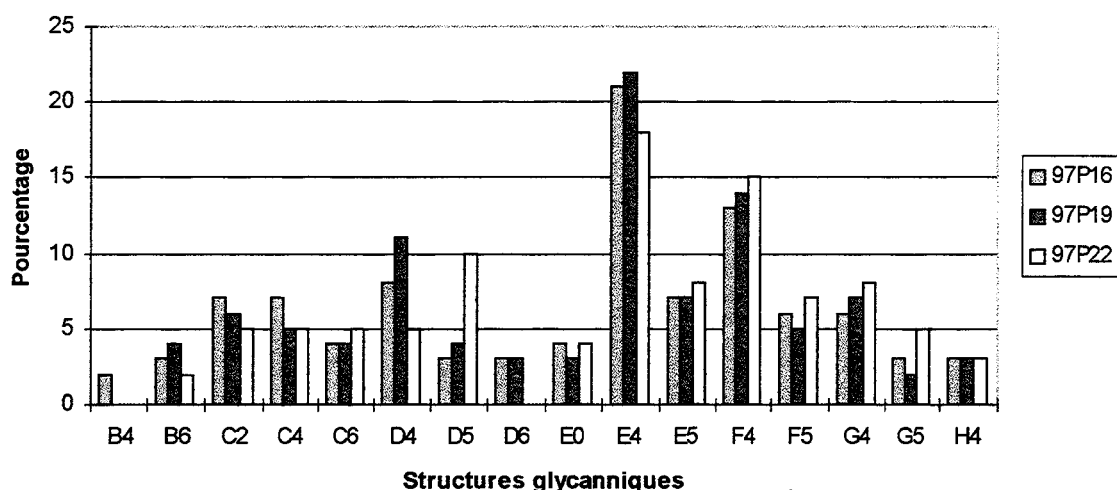
Les érythropoïétines 97P16 et 97P22 ont été traitées de la même façon que l'érythropoïétine 97P19. Trois fractions correspondant au site de glycosylation Asn-24 ont été collectées et analysées par spectrométrie de masse ES-MS.

Les spectres de masse des pics 4, 5 et 6 sont présentés dans les annexes 3, 9 et 15 pour l'érythropoïétine 97P16 et dans les annexes 6, 12 et 18 pour l'érythropoïétine 97P22. De même, l'ensemble des structures glycaniques déduites des masses observées sur les différents spectres est présenté dans les annexes 4, 10 et 16 pour les pics 4, 5 et 6 de l'érythropoïétine 97P16 et dans les annexes 7, 13 et 19 pour les pics 4, 5 et 6 de l'érythropoïétine 97P22. Enfin, les histogrammes présentant le pourcentage relatif de chacune des structures glycaniques décrites sont présentés dans les annexes 5, 11 et 17

pour les pics 4, 5 et 6 de l'érythropoïétine 97P16 et dans les annexes 8, 14 et 20 pour l'érythropoïétine 97P22.

### 3.4.3.2.6. Comparaison du site de glycosylation Asn-24 des 3 érythropoïétines humaines recombinantes

L'histogramme ci-dessous présente, pour le pic 4 des 3 érythropoïétines humaines recombinantes, le pourcentage des différentes structures glycaniques déduites à partir des spectres de masse respectifs.

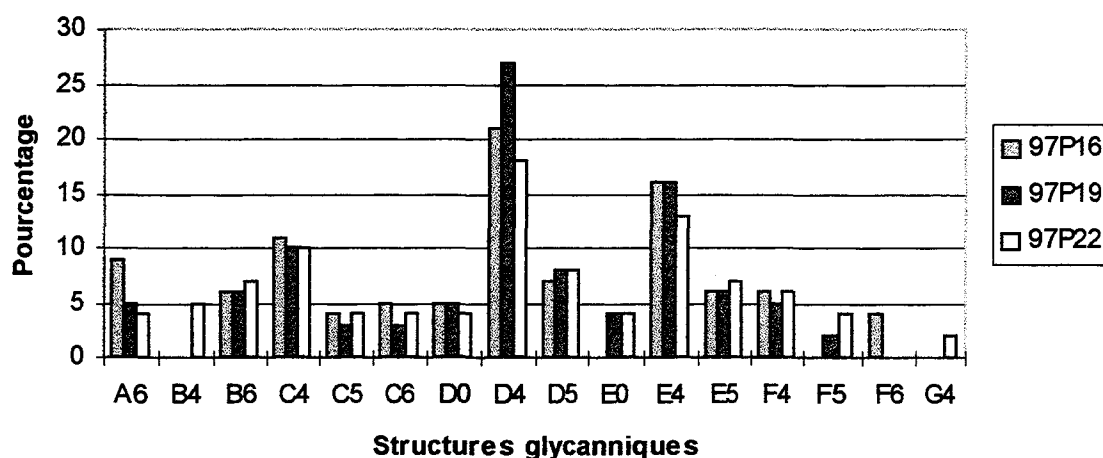


On constate que les 3 profils glycaniques apparaissent très similaires. On note que la majorité des glycanes sont de type tétraantenné (E0, E4, E5, F4, F5, G4, G5 et H4) et que, par rapport aux caractéristiques structurales énoncées pour l'érythropoïétine humaine recombinante 97P19, la majorité des glycanes possède un résidu de N-acétylhexosamine intercalaire.

-le glycanne D6, correspondant à une structure triantennée avec un fucose et deux résidus de N-acétylhexosamine supplémentaires, est absent de l'érythropoïétine 97P22.

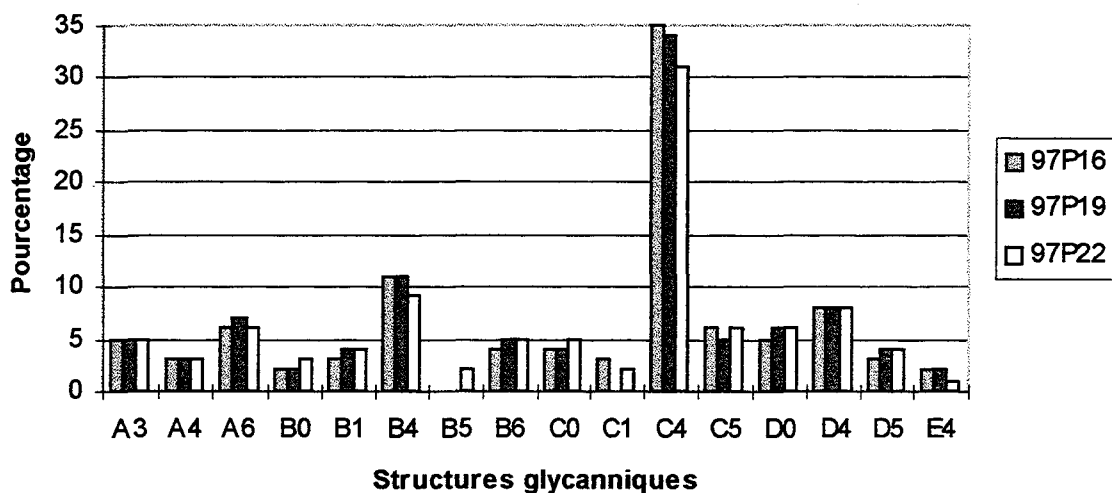
-le glycanne B4, correspondant à une structure de type monoantennée avec un fucose et un résidu de N-acétylhexosamine supplémentaire, n'est présent que dans l'érythropoïétine 97P16.

L'histogramme ci-dessous donne le pourcentage relatif de chacune des structures glycaniques présentes dans les glycopeptides du pic 5 des trois érythropoïétines humaines recombinantes.



Comme précédemment, les 3 profils glycaniques sont très voisins. Le glycanne F6, qui correspond à une structure tétraantennée avec un fucose, deux résidus de N-acétylhexosamine et une répétition N-acétyllactosaminique, n'est présent que dans l'érythropoïétine 97P16. Les glycannes G4 et B4 sont absents des érythropoïétines 97P16 et 97P19. Quant aux glycannes F5 et E0, ils sont tous deux absents de l'érythropoïétine 97P16. L'absence d'un de ces glycannes dans l'une des trois érythropoïétines humaines recombinantes peut signifier une absence de leur synthèse par la cellule. Mais, en raison de la faible proportion de ces structures glycaniques, il n'est pas exclu qu'elles existent et qu'elles n'aient pas été détectées par ES-MS.

L'histogramme ci-dessous indique le pourcentage relatif des différents glycanes déduits pour le pic 6 de chacun des trois lots d'érythropoïétines.

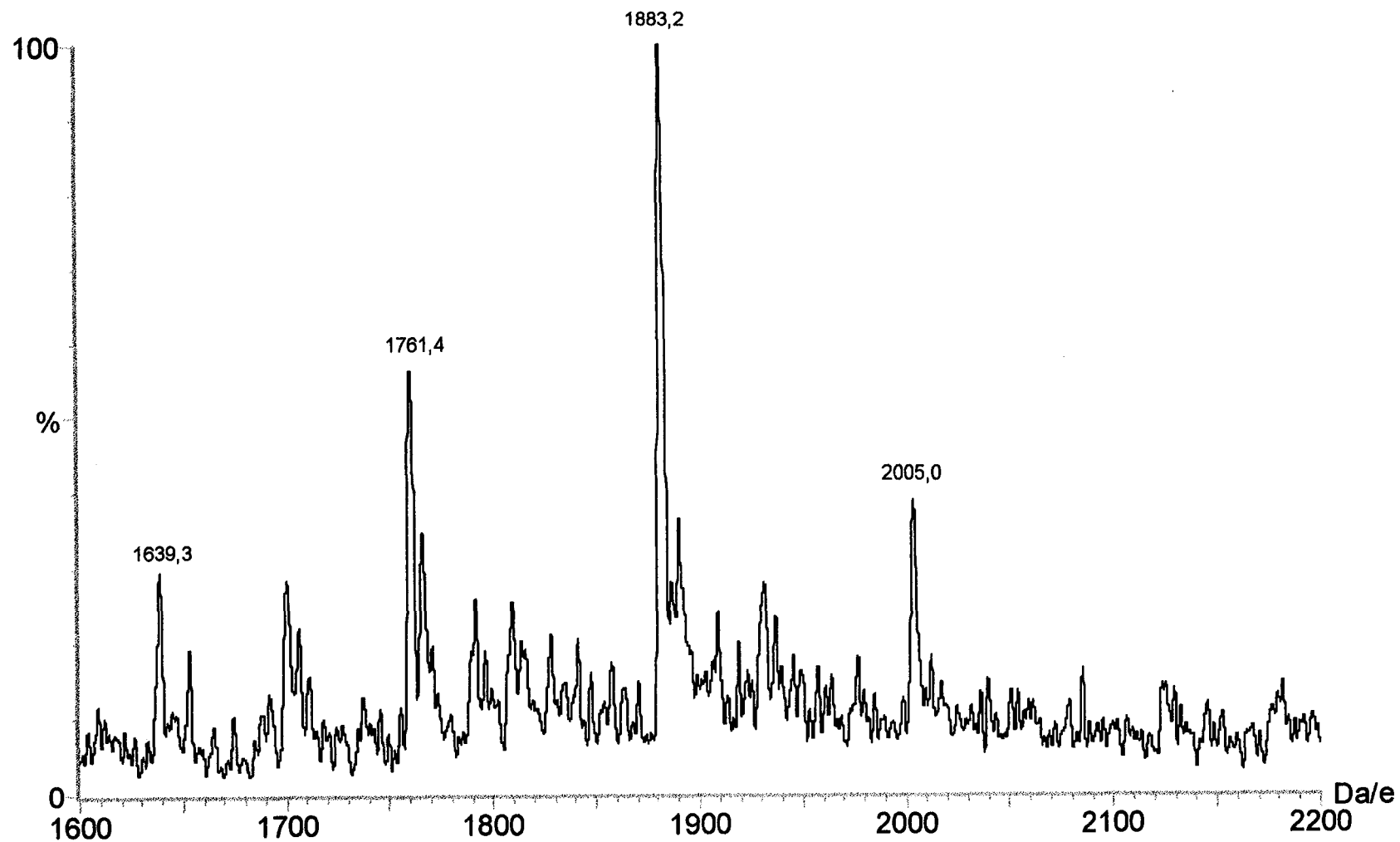


Comme pour les deux fractions précédentes, les profils glycaniques obtenus pour les trois érythropoïétines sont superposables à l'exception des glycanes C1 et B5. Le premier est absent de l'érythropoïétine humaine recombinante 97P19 alors que le second n'est présent que dans l'érythropoïétine humaine recombinante 97P22.

#### 3.4.3.2.7. Conclusion générale

La comparaison des profils de glycosylation du site Asn-24 pour les trois érythropoïétines humaines recombinantes ne fait pas apparaître de différences majeures tant qualitative (type de structure glycanique présente) que quantitative (pourcentage respectif des différentes structures glycaniques déduites). Les quelques différences observées sont liées à des petites variations dans les proportions de chaque glycanne et/ou à l'absence de structures faiblement représentées. Parce que les glycopeptides des 3 pics HPLC ont été analysés séparément, il est impossible de déterminer le pourcentage total d'une structure glycanique présente dans un glycopeptide commun à 2 pics voire 3 pics. Il aurait fallu, pour cela, disposer d'un standard interne et calculer le pourcentage des différents glycanes





**Figure 14 :** Spectre de masse correspondant aux N-glycopeptides désialylés du pic 15 du site de glycosylation Asn-38 de l'érythropoïétine humaine recombinante 97P19 obtenu par LC-MS.

décrits par rapport à ce standard. Toutefois, il apparaît à la lecture de ces résultats, que la proportion de structures glycaniques de type biantenné et triantenné est relativement importante et rejoint en ce sens les données bibliographiques qui font état de la proportion la plus élevée de ces glycanes pour le site de glycosylation Asn-24 des différentes érythropoïétines décrites (comparée aux sites de glycosylation Asn-38 et Asn-83). La comparaison des structures établies pour les glycanes du site Asn-24 des 3 érythropoïétines humaines recombinantes 97P16, 97P19 et 97P22 avec celles publiées pour les différentes érythropoïétines humaines étudiées (urinaire ou recombinantes) s'arrête là. En effet, nos résultats tendent à démontrer que certains glycanes sont difucosylés et possèdent un résidu de N-acétylglucosamine intercalaire. De telles caractéristiques structurales n'ont à ce jour, jamais été décrites pour une molécule d'érythropoïétine. De même, le nombre de répétition N-acétyllactosaminique apparaît plus élevé dans le cas de nos 3 érythropoïétines.

Enfin, il convient de souligner que des structures glycaniques tronquées sont présentes dans des proportions similaires, dans les 3 cas. Si l'on compare ces résultats avec les conditions de production des 3 érythropoïétines humaines recombinantes, nous pouvons considérer que ni le milieu de culture (avec ou sans sérum de veau foetal), ni le mode de culture (cytoculteur de type perfusion ou de type « batch ») n'ont influencé la glycosylation de ce site.

#### **3.4.3.3. Analyse du site de glycosylation Asn-38 désialylé**

Le séquençage de tous les peptides et glycopeptides obtenus après hydrolyse par l'endoprotéinase Glu-C a révélé que les glycopeptides correspondant au site Asn-38 étaient élués sous la forme de deux pics : pics 15 et 16 (fig. 8 page 96). Ces deux pics ont été collectés séparément puis étudiés par spectrométrie de masse en mode LC-MS.

**Tableau 11 :** Structures glycaniques déduites d'après les ions de masse  $m/z$  observés sur le spectre de masse (Fig. 14) correspondant au pic 15 du site de glycosylation Asn-38 de l'érythropoïétine humaine recombinante 97P19.

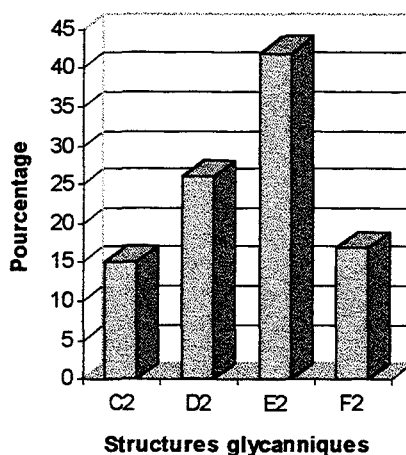
masse observée	état de charge	masse déconvoluée	structure glycanique déduite	masse théorique	pourcentage
1639,3	+3	4914,9	C2 <sup>a</sup>	4916,2 <sup>b</sup>	15
1761,4	+3	5281,2	D2	5281,5	26
1883,2	+3	5646,6	E2	5646,9	42
2005,0	+3	6012,0	F2	6012,2	17

<sup>a</sup> d'après la nomenclature du tableau 6.

<sup>b</sup> la masse théorique du glycopeptide a été obtenue en ajoutant à la masse théorique du peptide (3000,4 Da) celle du glycanne et en retranchant la masse correspondant à l'élimination d'une molécule d'eau.

### 3.4.3.3.1. Analyse du pic 15 du site de glycosylation Asn-38 de l'érythropoïétine humaine recombinante 97P19

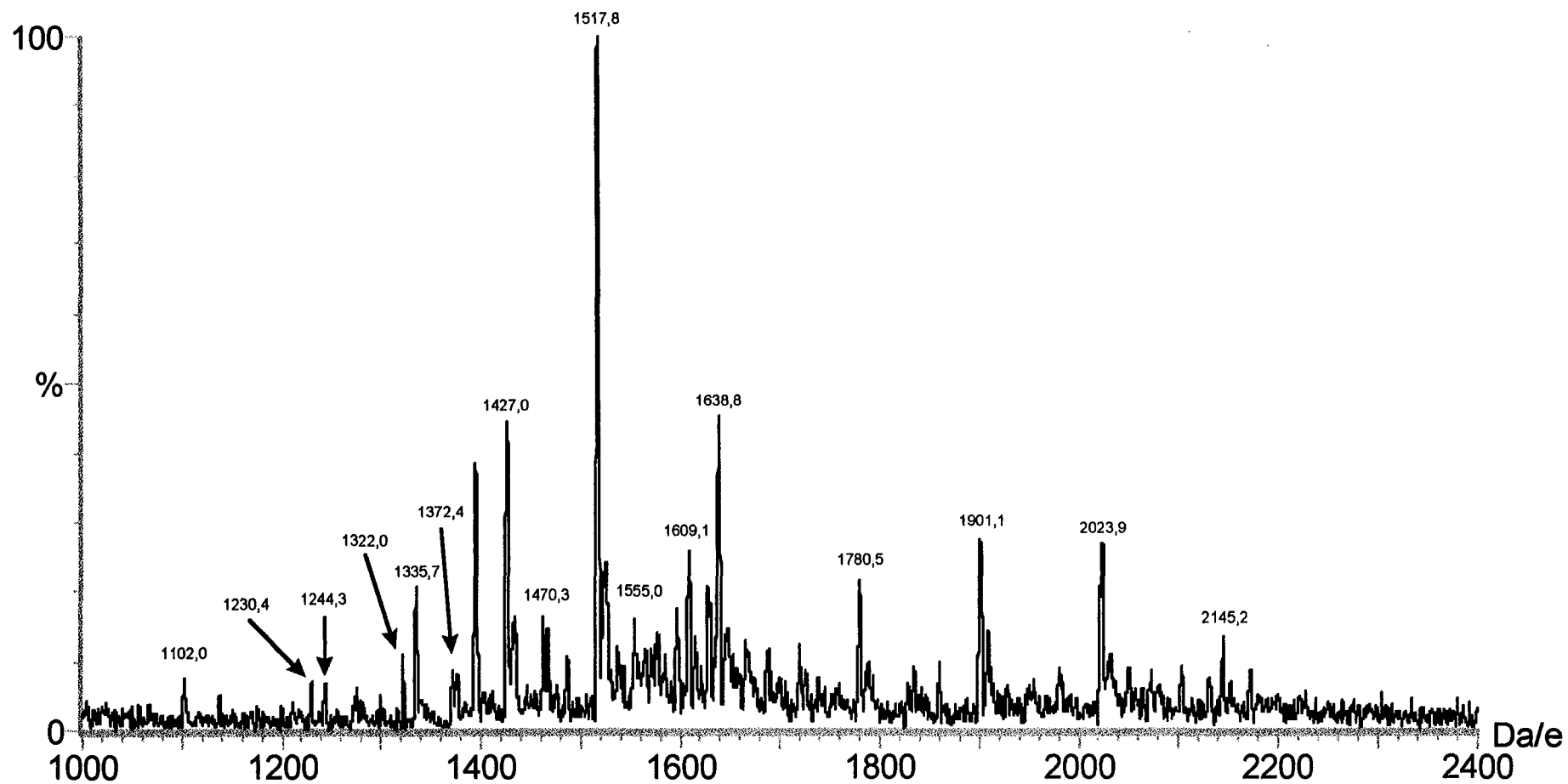
Le spectre de masse présenté dans la figure 14 ne montre que quatre espèces moléculaires différentes dont les masses  $m/z$  vont de 1639,3 à 2005,0 u.m.a.. Après avoir attribué l'état de charge pour chacun des ions moléculaires, la masse moléculaire des glycopeptides correspondants a pu être calculée. Le tableau 11 présente l'ensemble des structures glycaniques déduites ainsi que leur pourcentage respectif représenté également dans l'histogramme ci-dessous.



On note dans cette fraction la présence de structures glycaniques biantennées (C2, 15%), triantennées (D2, 26%), tétraantennées (E2, 42%) et tétraantennées avec une répétition N-acétyllactosaminique (F2, 17%). Signalons que dans ce pic, a été observée, en plus des différents glycopeptides cités ci-dessus, la présence d'un peptide contaminant (non visible sur le spectre de la fig. 14).

La particularité de cette fraction est de ne contenir que des glycannes difucosylés ne possédant aucun résidu de N-acétylhexosamine intercalaire.

L'hétérogénéité glycanique associée au peptide renfermant le site Asn-38 et élué dans le pic 15 est donc faible. De façon générale, le taux d'antennarisation est élevé puisque l'on



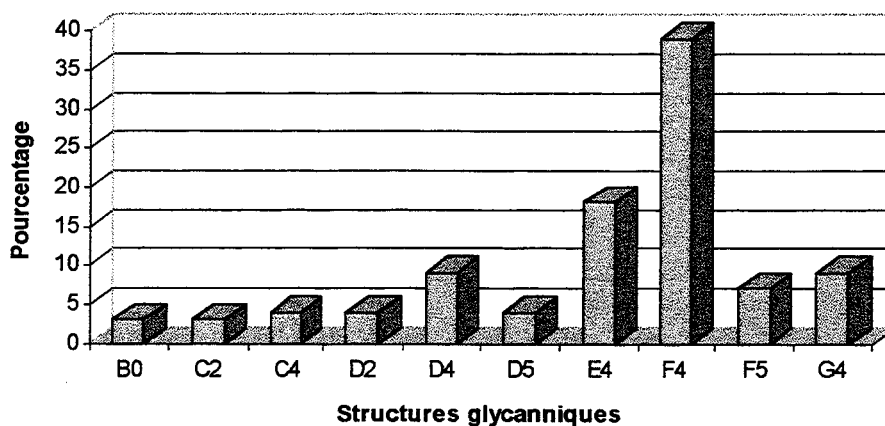
**Figure 15 :** Spectre de masse correspondant aux N-glycopeptides désialylés du pic 16 du site de glycosylation Asn-38 de l'érythropoïétine humaine recombinante 97P19 obtenu par LC-MS.

trouve environ 59% de glycanes de type tétraantenné (E2 et F2), dont 17% contiennent une répétition N-acétyllactosaminique (F2).

#### 3.4.3.3.2. Analyse du pic 16 du site de glycosylation Asn-38 de l'érythropoïétine humaine recombinante 97P19

Le spectre de masse présenté dans la figure 15 montre, par la présence des nombreux ions moléculaires dont la masse  $m/z$  est comprise entre 1102,0 et 2145,2 u.m.a., une hétérogénéité supérieure à celle du pic 15. Les différentes structures glycaniques ont été déduites de la même façon que pour les pics 4, 5 et 6 du site Asn-24. Le tableau 12 présente l'ensemble de ces structures ainsi que leur pourcentage respectif.

L'analyse du tableau 12 révèle la présence de structures mono, bi, tri et tétraantennée avec 1 ou 2 fucose(s), un résidu de N-acétylhexosamine supplémentaire dans la majorité des cas ainsi que des répétitions N-acétyllactosaminiques dont le nombre varie de 1 à 2.



L'histogramme ci-dessus montre que le glycanne majoritaire (F4, 39%) est de type tétraantenné possédant un résidu de fucose, un résidu de N-acétylhexosamine supplémentaire et une répétition N-acétyllactosaminique.

**Tableau 12 :** Structures glycaniques déduites d'après les ions de masse  $m/z$  observés sur le spectre de masse (Fig. 15) correspondant au pic 16 du site de glycosylation Asn-38 de l'érythropoïétine humaine recombinante 97P19.

masse observée	état de charge	masse déconvoluée	structure glycanique déduite	masse théorique	pourcentage
1470,3	+3	4405,9	B0 <sup>a</sup>	4404,7 <sup>b</sup>	3
1102,0	+4				
1638,8	+3	4915,5	C2	4916,2	3
1230,4	+4				
1244,3	+4	4973,2	C4	4973,2	4
1322,0	+4	5284,0	D2	5281,5	4
1780,5	+3	5338,7	D4	5338,6	9
1335,7	+4				
1372,4	+4	5485,6	D5	5484,7	4
1901,1	+3	5702,2	E4	5703,9	18
1427,0	+4				
2023,9	+3	6068,0	F4	6069,3	39
1517,8	+4				
1555,0	+4	6216,0	F5	6215,4	7
2145,2	+3	6432,5	G4	6434,6	9
1609,1	+4				

<sup>a</sup> d'après la nomenclature du tableau 6.

<sup>b</sup> la masse théorique du glycopeptide a été obtenue en ajoutant à la masse théorique du peptide (3000,4 Da) celle du glycanne et en retranchant la masse correspondant à l'élimination d'une molécule d'eau.

Les glycanes des glycopeptides élués dans ce pic se caractérisent par leur taux d'antennarisation très élevé puisqu'environ 73% d'entre eux sont tétraantennés. Les glycanes triantennés ne représentent que 17% et les biantennés 7%.

Par rapport à l'analyse du pic précédent, on peut noter la présence de structures monoantennées en faible quantité (3%). La majorité des glycanes (environ 90%) contiennent des résidus de N-acétylhexosamine intercalaires. Le pourcentage de glycanes difucosylés n'est que de 18% (rappelons que les glycanes présents dans les glycopeptides du pic 15 étaient tous difucosylés).

#### 3.4.3.3. Conclusion

L'hétérogénéité du site de glycosylation Asn-38 est élevée puisque 12 structures glycaniques différentes sont décrites (tableau 13). Cette hétérogénéité est vraisemblablement beaucoup plus importante car les résultats ci-dessus ne tiennent pas compte de la présence des acides sialiques.

Le taux d'antennarisation ainsi que le taux de répétitions N-acétyllactosaminiques apparaissent plus élevés que ceux obtenus pour le site Asn-24, rejoignant ainsi les observations faites pour l'érythropoïétine humaine urinaire ou les érythropoïétines humaines recombinantes produites dans les cellules CHO ou BHK.

Comme précédemment, on note la présence de glycanes difucosylés et de glycanes possédant des N-acétylglucosamines intercalaires.



**Tableau 13 :** Ensemble des structures glycaniques décrites pour le site Asn-38 de l'érythropoïétine humaine recombinante 97P19.

structures glycaniques	
	ou
	ou
	ou
	ou
	ou

#### 3.4.3.3.4.Cas des érythropoïétines humaines recombinantes 97P16 et 97P22

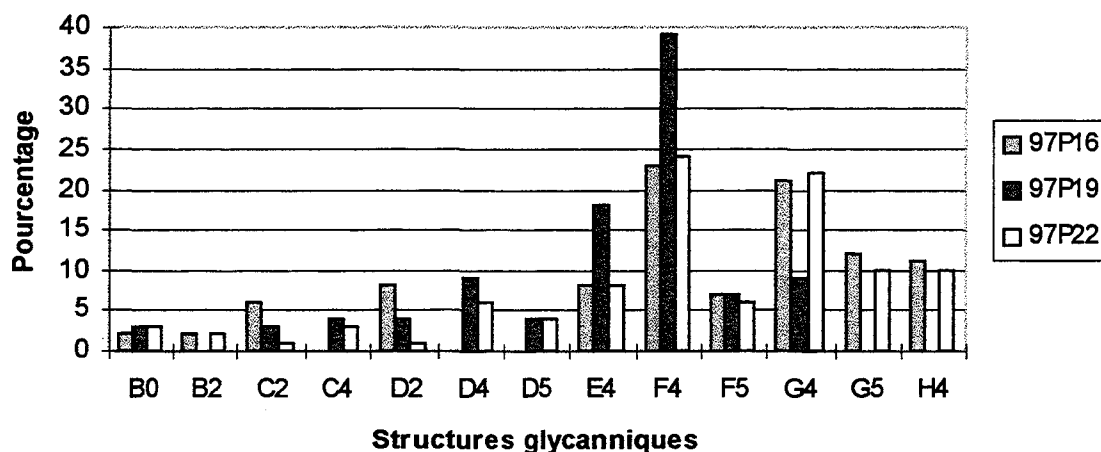
Le site de glycosylation Asn-38 des érythropoïétines humaines recombinantes 97P16 et 97P22 a été traité dans des conditions d'analyses strictement identiques à celui de l'érythropoïétine humaine recombinante 97P19.

#### 3.4.3.3.5.Comparaison du site Asn-38 des 3 érythropoïétines humaines recombinantes

A la différence de l'analyse du pic 15 de l'érythropoïétine humaine recombinante 97P19, l'analyse ES-MS du pic 15 des érythropoïétines 97P16 et 97P19 n'a pas révélé la présence de glycopeptides. Seul un peptide contaminant (le même que celui observé lors de l'analyse ES-MS du pic 15 de l'érythropoïétine 97P19) a été observé.

Quant à l'analyse ES-MS des glycopeptides du pic 16, à quelques exceptions près, des résultats similaires à ceux du pic 16 de l'érythropoïétine 97P19 ont été obtenus. Le spectre de masse du pic 16 est présenté dans l'annexe 21 pour l'érythropoïétine 97P16 et dans l'annexe 24 pour l'érythropoïétine 97P22. De même, l'ensemble des structures glycaniques déduites des masses observées sur le spectre est présentée dans les annexes 22 et 25 pour le pic 16 de l'érythropoïétine 97P16 et 97P22 respectivement et les histogrammes, représentant les pourcentages relatifs de chaque structure glycanique, sont présentés dans les annexes 23 pour le pic 16 de l'érythropoïétine 97P16 et 26 pour le pic 16 de l'érythropoïétine 97P22.

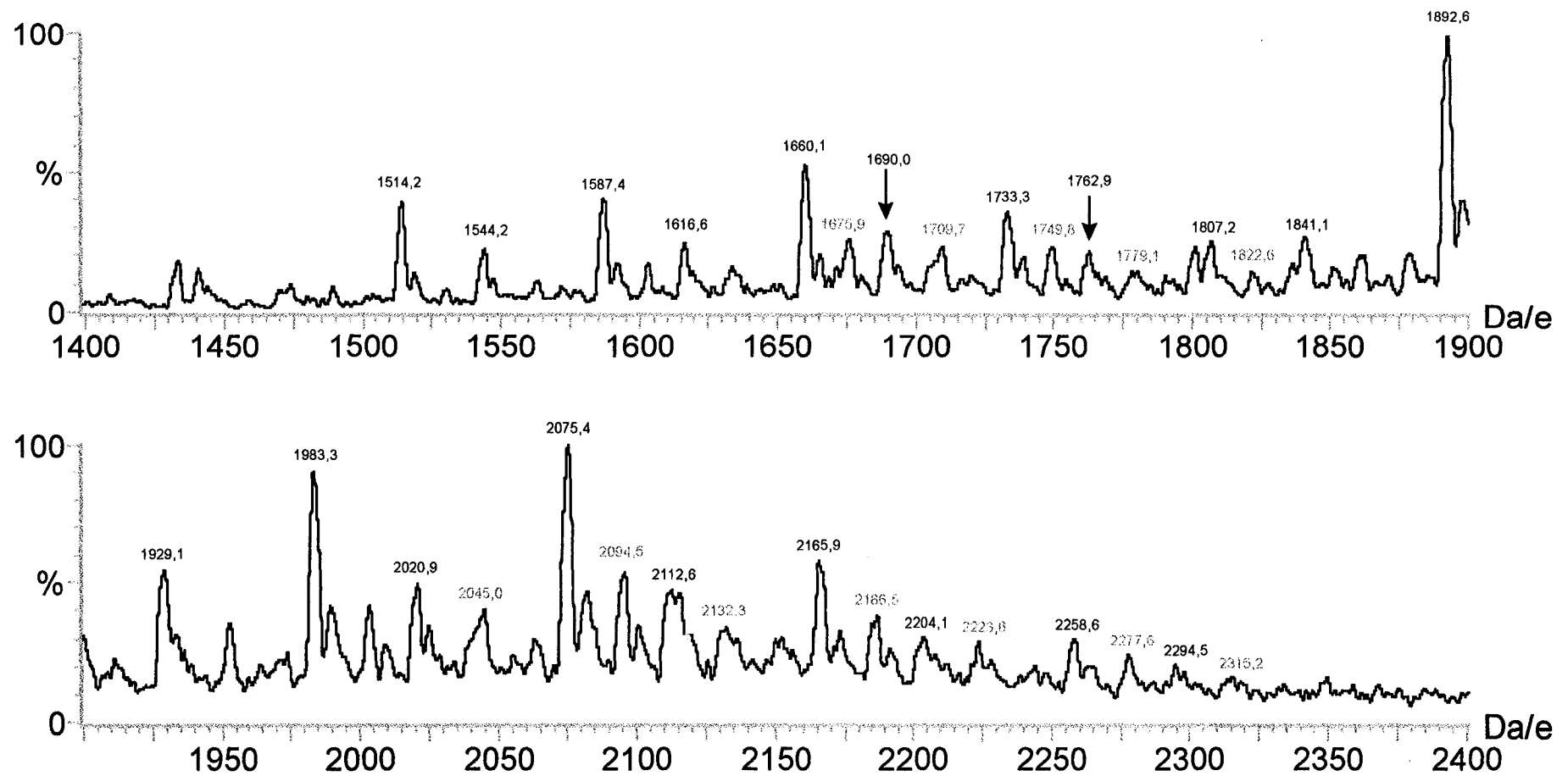
L'histogramme ci-dessous présente l'ensemble des structures glycaniques déduites pour le pic 16 du site Asn-38 des 3 érythropoïétines humaines recombinantes étudiées ainsi que le pourcentage respectif de chacune d'elles.



On constate que l'ensemble des structures glycaniques décrites pour ce pic 16 est présent dans l'érythropoïétine 97P22. On note l'absence des glycanes B2, G5 et H4 (pour l'érythropoïétine 97P19) et des glycanes C4, D4 et D5 (pour l'érythropoïétine 97P16).

La comparaison des taux respectifs des glycanes présents dans les 3 érythropoïétines humaines recombinantes fait apparaître, pour certains, des différences significatives. C'est le cas notamment des glycanes E4 et F4 dont le taux est augmenté de façon nette dans l'érythropoïétine 97P19 alors que le taux du glycanne G4 est fortement diminué pour cette même érythropoïétine. En fait, ces différences ne reposent que sur la variation du nombre de répétitions N-acétyllactosaminiques présent dans ces trois glycanes.

En ce qui concerne la proportion des glycanes difucosylés, on constate que le taux le plus élevé concerne l'érythropoïétine humaine recombinante 97P16 (35%) suivie des érythropoïétines humaines recombinantes 97P22 (24%) et 97P19 (18%). Toutefois, rappelons que, pour cette dernière, le taux de glycanes difucosylés élués dans le pic 15, n'a pas été pris en compte dans l'histogramme ci-dessus. Pour les mêmes raisons, le taux de glycanes possédant des répétitions N-acétyllactosaminiques apparaît plus faible dans les glycopeptides de l'érythropoïétine humaine recombinante 97P19 (55%) élués dans le pic 16



**Figure 16 :** Spectre de masse correspondant aux N-glycopeptides désialylés du site de glycosylation Asn-83 de l'érythropoïétine humaine recombinante 97P19 obtenu par LC-MS.

que celui déterminé dans les glycopeptides des érythropoïétines humaines recombinantes 97P16 et 97P22 (74% et 72% respectivement), élués également dans le pic 16.

Enfin, plus de 80% des glycanes du site Asn-38 renferment une N-acétylhexosamine intercalaire. Notons que ce taux atteint respectivement 90% et 94% pour les 2 érythropoïétines 97P19 et 97P22.

#### 3.4.3.3.6. Conclusion générale

La majorité des glycanes présents sur le site de glycosylation Asn-38 des érythropoïétines humaines recombinantes produites dans CHO ou BHK est représentée par des structures tétraantennées avec ou sans répétition(s) N-acétyllactosaminique(s). Si les résultats obtenus pour les 3 érythropoïétines humaines recombinantes analysées sont en accord avec ceux de l'érythropoïétine humaine urinaire pour le taux d'antennarisation (environ 73% de N-glycanes tétraantennés pour nos 3 érythropoïétines humaines recombinantes contre 81% pour l'érythropoïétine humaine urinaire), on note une grande divergence dans le taux de glycanes possédant des répétitions N-acétyllactosaminiques puisque ce taux est de 73% dans nos érythropoïétines humaines recombinantes contre 5% pour l'érythropoïétine humaine urinaire. Cette observation confirme la tendance soulignée pour le site de glycosylation Asn-24 selon laquelle la proportion et le nombre de répétitions N-acétyllactosaminiques présentes dans les glycanes étaient supérieurs à ceux de l'érythropoïétine humaine urinaire. Ce fait constitue une autre caractéristique structurale des chaînes glycaniques de nos 3 érythropoïétines, en plus de celles déjà décrites pour le site de glycosylation Asn-24 et qui se retrouvent dans ce site (hyperfucosylation et présence de résidu de N-acétylglucosamine intercalaire).

**Tableau 14 :** Structures glycaniques « non substituées » déduites d'après les ions de masse  $m/z$  observés sur le spectre de masse (Fig. 16) correspondant au site de glycosylation Asn-83 de l'érythropoïétine humaine recombinante 97P19.

masse observée	état de charge	masse déconvoluée	structure glycanique déduite	masse théorique	pourcentage
1841,1	+4	7363,2	E0 <sup>a</sup>	7365,9 <sup>b</sup>	3
1474,2	+5				
1892,6	+4	7566,2	E4	7569,1	11
1514,2	+5				
1929,1	+4	7714,0	E5	7715,3	6
1544,1	+5				
1983,3	+4	7930,6	F4	7934,4	10
1587,4	+5				
2020,9	+4	8078,8	F5	8080,6	6
1616,6	+5				
2075,4	+4	8296,6	G4	8299,8	12
1660,1	+5				
2112,6	+4	8445,7	G5	8445,9	5
1690,0	+5				
2165,9	+4	8660,6	H4	8665,1	7
1733,3	+5				
2204,1	+4	8811,0	H5	8811,3	4
1762,9	+5				
2258,6	+4	9030,7	I4	9030,5	4
1807,2	+5				
2294,5	+4	9174,0	I5	9176,6	2
2349,6	+4	9394,4	J4	9395,8	2

<sup>a</sup> d'après la nomenclature du tableau 6.

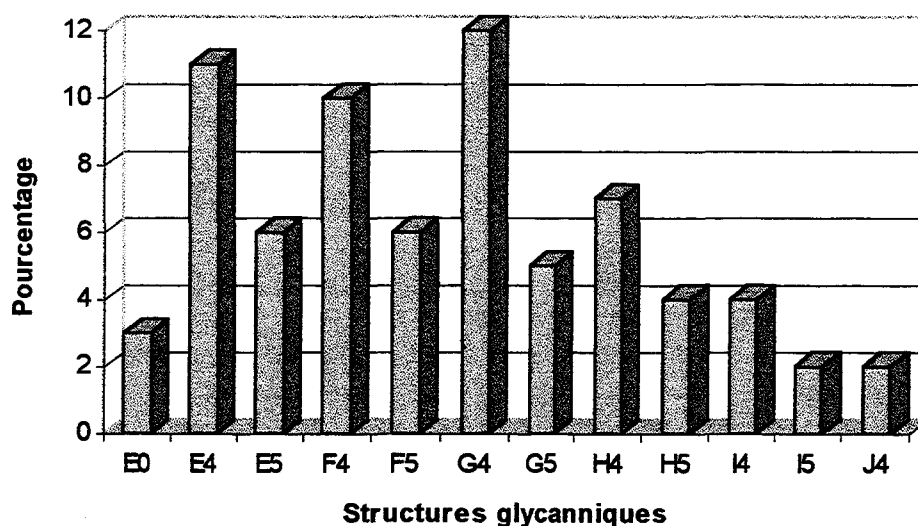
<sup>b</sup> la masse théorique du glycopeptide a été obtenue en ajoutant à la masse théorique du peptide (4865,6 Da) celle du glycanne et en retranchant la masse correspondant à l'élimination d'une molécule d'eau.

### 3.4.3.4. Analyse du site de glycosylation Asn-83 désialylé

A l'inverse de l'étude des deux sites de glycosylation précédents, le séquençage peptidique a révélé que les glycopeptides correspondant au site Asn-83 étaient tous élués dans un même pic (pic 24 sur le chromatogramme de la figure 8 de la page 96). Cette fraction a été collectée puis étudiée par spectrométrie de masse en mode LC-MS.

#### 3.4.3.4.1. Analyse du site Asn-83 de l'érythropoïétine humaine recombinante 97P19

Le spectre de masse, présenté dans la figure 16, fait apparaître plusieurs ions moléculaires de masse  $m/z$  comprise entre 1474,2 et 2349,6 u.m.a.. Le tableau 14 présente l'ensemble des structures glycaniques déduites (à partir des masses écrites en noir) ainsi que leur pourcentage relatif présenté dans l'histogramme ci-dessous.



L'examen de ce dernier révèle que toutes les structures glycaniques sont de type tétraantenné (structure de E à J dans notre nomenclature).

Les structures majoritaires correspondent aux glycanes G4 (12%), E4 (11%) et F4 (10%).

Hormis les glycanes E0, E4 et E5, tous les autres renferment des répétitions N-acétyllactosaminiques en nombre important. Ainsi, la structure glycanique déduite de l'ion

**Tableau 15 :** Structures glycaniques « substituées » déduites d'après les ions de masse  $m/z$  observés sur le spectre de masse (Fig. 16) correspondant au site de glycosylation Asn-83 de l'érythropoïétine humaine recombinante 97P19.

masse observée	état de charge	masse déconvoluée	structure glycanique déduite	masse théorique	pourcentage
2045,0	+4	8176,0	G7 <sup>a</sup>	8176,6 <sup>b</sup>	5
2094,5	+4	8374,3	G8	8379,9	6
1675,9	+5				
2132,3	+4	8525,2	G9	8526,0	4
1709,7	+5	8543,5	H7	8542,0	1
2186,5	+4	8743,0	H8	8745,2	4
1749,8	+5				
2223,6	+4	8890,5	H9	8891,3	3
1779,1	+5				
2277,6	+4	9107,2	I8	9110,5	3
1822,6	+5				
2315,2	+4	9256,8	I9	9256,7	2

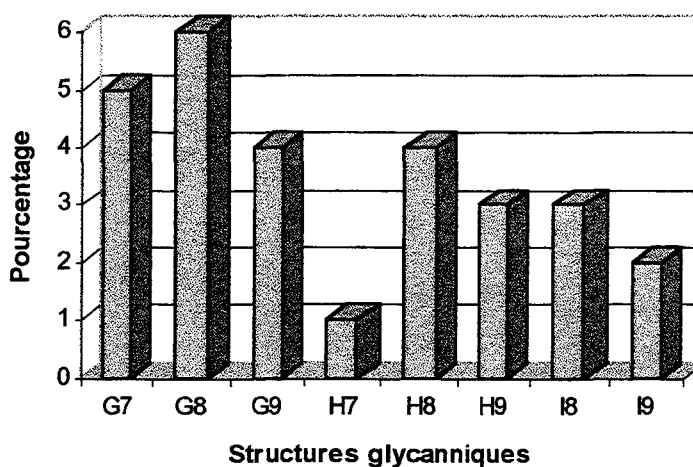
<sup>a</sup> d'après la nomenclature du tableau 6.

<sup>b</sup> la masse théorique du glycopeptide a été obtenue en ajoutant à la masse théorique du peptide (4865,6 Da) celle du glycanne et en retranchant la masse correspondant à l'élimination d'une molécule d'eau.



moléculaire 2349,6 u.m.a. (fig. 16) correspond à un glycanne tétraantenné avec 5 répétitions N-acétyllactosaminiques (J4).

Nous avons constaté qu'il existait, en plus des glycanes décrits ci-dessus, des glycanes dont la masse présentait un excédent de masse de 80 Da (masses écrites en bleu) (tableau 15). Cet incrément de masse est celui observé lorsqu'un groupement sulfate ou phosphate est présent sur une molécule. Comme le montre l'histogramme ci-dessous, les glycanes qui seraient porteurs d'un tel groupement et que nous nommerons glycanes « substitués » dans la suite de l'exposé, sont présents en quantité non négligeable (28%).



Toutefois, il est important de signaler qu'aucune autre preuve de leur existence n'a été obtenue. Il conviendrait de préparer, par hydrazinolyse ou par action de la PNGase, les N-glycanes du site Asn-83 afin d'enrichir la population glycanique sulfatée ou phosphatée et de démontrer, par des analyses RMN, l'existence de groupements sulfate ou phosphate.

Les structures glycaniques correspondant à ces formes sulfatées ou phosphatées possèdent comme précédemment des masses moléculaires très élevées qui rendent compte de leur type tétraantenné et de la présence d'un nombre important de répétitions N-acétyllactosaminiques. On retrouve également les mêmes caractéristiques structurales que celles décrites pour les glycanes « non substitués » de ce site de glycosylation, qui sont la

**Tableau 16 :** Ensemble des structures glycaniques décrites pour le site Asn-83 de l'érythropoïétine humaine recombinante 97P19.

structures glycaniques	structures glycaniques

présence, pour certains glycanes, de 2 résidus de fucose (32%) et/ou d'un résidu de N-acétylglucosamine intercalaire (78%).

Les glycanes majoritaires sont représentés par les glycanes G8 (6%), G7 (5%), G9 (4%) et H8 (4%).

#### 3.4.3.4.2. Conclusion

L'ensemble des structures glycaniques décrites pour le site de glycosylation Asn-83 de l'érythropoïétine humaine recombinante est récapitulé dans le tableau 16 qui montre une hétérogénéité élevée puisque 20 structures différentes sont décrites (sans tenir compte de l'hétérogénéité liée à la présence des acides sialiques).

#### 3.4.3.4.3. Cas des érythropoïétines humaines recombinantes 97P16 et 97P22

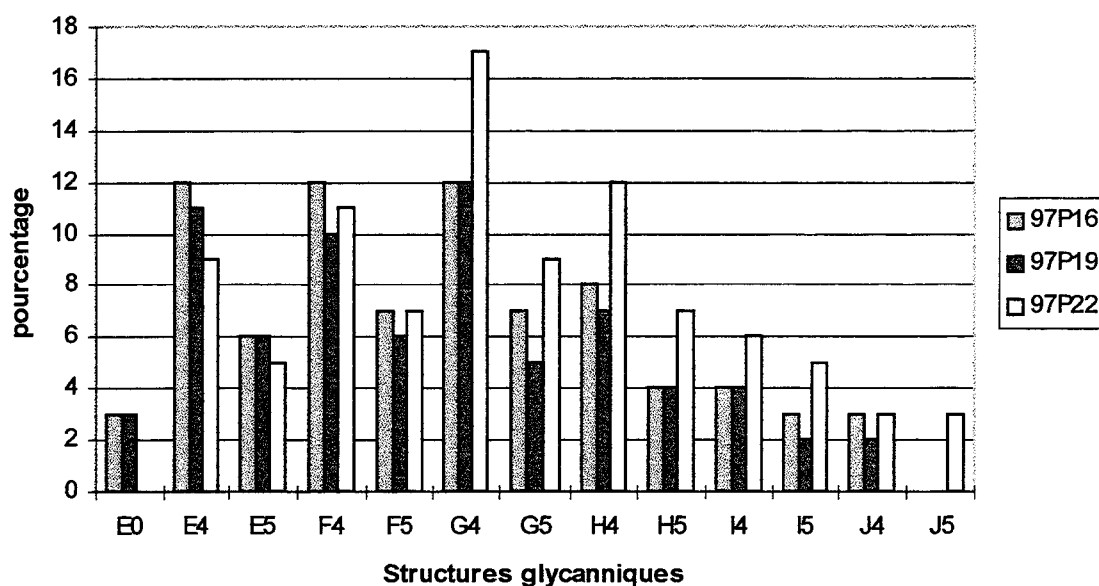
Comme précédemment, le site de glycosylation Asn-83 des érythropoïétines humaines recombinantes 97P16 et 97P22 a été traité de la même façon que celui de l'érythropoïétine humaine recombinante 97P19.

#### 3.4.3.4.4. Comparaison du site Asn-83 des 3 érythropoïétines humaines recombinantes

Le spectre de masse est présenté dans l'annexe 27 pour l'érythropoïétine 97P16 et 32 pour l'érythropoïétine 97P22. L'ensemble des structures glycaniques déduites des masses observées est présenté dans les annexes 28 et 33 pour les glycanes « non substitués » des érythropoïétines 97P16 et 97P22 et dans les annexes 30 et 35 pour les glycanes « substitués » des érythropoïétines humaines recombinantes 97P16 et 97P22 respectivement. Quant aux histogrammes représentant les pourcentages relatifs de chaque

structure glycanne, ils sont présentés dans les annexes 29 et 34 pour les glycanes « non substitués » des érythropoïétines 97P16 et 97P22 ainsi que dans les annexes 31 et 36 pour les glycanes substitués des érythropoïétines humaines recombinantes 97P16 et 97P22.

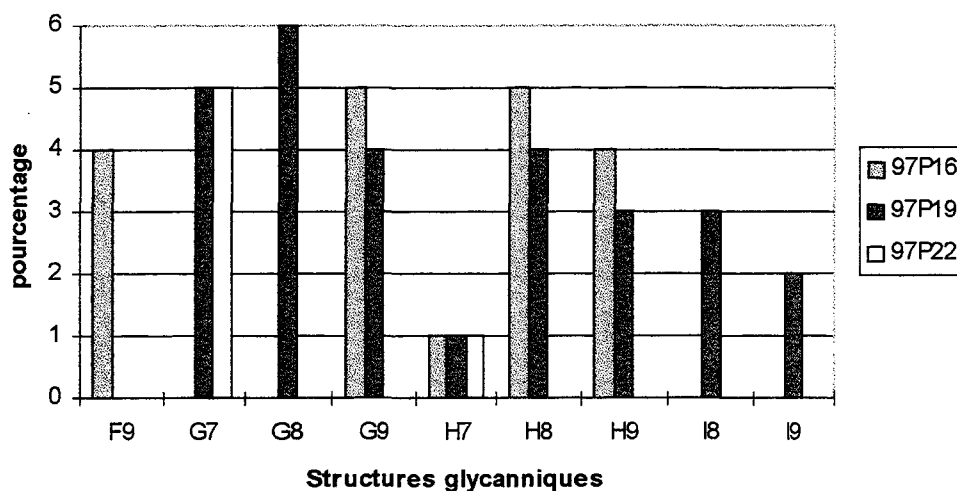
L'histogramme ci-dessous présente le pourcentage des structures glycanne « non substituées » déduites pour le site 83 des 3 érythropoïétines humaines recombinantes.



Alors que les profils glycanne des 2 érythropoïétines humaines recombinantes 97P16 et 97P19 apparaissent semblables, on note quelques différences pour celui de l'érythropoïétine 97P22. En effet, on remarque, pour ce dernier, que le pourcentage des glycanne G4, G5, H4, H5, I4 et I5 apparaît sensiblement plus élevé que celui calculé pour les mêmes glycanne des érythropoïétines humaines recombinantes 97P16 et 97P19. De plus, le glycanne J5 est absent des érythropoïétines 97P16 et 97P19 alors que le glycanne E0 est quant à lui absent de l'érythropoïétine humaine recombinante 97P22.

L'augmentation du pourcentage de ces structures s'explique à la vue de l'histogramme ci-dessous qui présente le pourcentage des différents glycanne sulfatés ou phosphatés. En effet, très peu de glycanne issus du site de glycosylation Asn-83 de l'érythropoïétine 97P22

apparaissent sulfatés ou phosphatés ce qui explique que la proportion des glycanes « non substitués » correspondants soit plus importante pour cette érythropoïétine humaine recombinante.



#### 3.4.3.4.5. Conclusion générale

Globalement, le site de glycosylation Asn-83 des 3 érythropoïétines humaines recombinantes 97P16, 97P19 et 97P22 apparaît très semblable. Le nombre de répétitions N-acétyllactosaminiques est très élevé (jusque 5 répétitions) laissant supposer l'existence d'unités polylactosaminiques (enchaînement de plusieurs répétitions N-acétyllactosaminiques liées par une liaison  $\beta$ -(1→3) ou  $\beta$ -(1→6)) au sein de ce site de glycosylation.

Rappelons que le site de glycosylation Asn-83 de l'érythropoïétine humaine urinaire contient 62% de structures glycaniques tétraantennées fucosylées, 24% de glycanes triantennées fucosylées et 14% de glycanes tétraantennées fucosylées possédant une répétition N-acétyllactosaminique. En ce qui concerne les érythropoïétines humaines recombinantes produites par les cellules CHO et BHK, un même profil glycanique similaire

à celui de l'érythropoïétine humaine urinaire a été retrouvé avec toutefois un nombre de répétitions N-acétyllactosaminiques plus important (de 1 à 3). Dans les deux types d'érythropoïétines cités ci-dessus (urinaire et recombinante), la majorité des glycanes sont monofucosylés. La comparaison de ces profils glycaniques avec ceux décrits pour nos 3 érythropoïétines humaines recombinantes révèle i) une hétérogénéité glycanique plus grande (12 structures différentes sans tenir compte de la présence additionnelle pour certains de groupements sulfates ou phosphates), ii) la présence de répétitions N-acétyllactosaminiques en nombre plus élevé comme pour les structures glycaniques des sites Asn-24 et 38, iii) la présence de glycanes difucosylés et/ou de résidu de N-acétylhexosamine intercalaire (également mentionnée pour les 2 sites de N-glycosylation Asn-24 et asn-38) et iv) l'existence vraisemblable de glycanes sulfatés ou phosphatés.

### **3.5. Vérification des caractéristiques structurales des 3 érythropoïétines humaines recombinantes par méthylation**

Lors de la détermination du taux de sialylation et des pourcentages de liaisons sialyles  $\alpha$ -(2→3) et  $\alpha$ -(2→6) de nos 3 érythropoïétines humaines recombinantes par l'analyse GC/MS des dérivés méthylgalactopyrannosides (deutérométhylés ou éthylés ou perméthylés), nous avons mis à profit cette stratégie pour étudier les différents dérivés méthylglycosides obtenus à partir des autres monosaccharides présents dans ces molécules. Nous avons notamment essayé de confirmer i) la présence de N-acétylglucosamine intercalaire et/ou ii) d'un second résidu de fucose (et de sa liaison) dans certains glycanes, iii) du haut degré d'antennarisation et iv) du taux de répétitions N-acétyllactosaminiques.

#### **3.5.1. Vérification de la présence de N-acétylglucosamine intercalaire**

Les structures N-glycanniques déduites des analyses ES-MS des glycopeptides des 3 érythropoïétines humaines recombinantes font apparaître, de façon surprenante, l'existence dans 90% des cas, de résidus de N-acétylglucosamine intercalaire. Afin de vérifier ce point, nous avons recherché la présence de résidus de N-acétylglucosamine perméthylés sur les différents chromatogrammes de CPG en phase gazeuse. L'obtention d'un pic important ayant le même temps de rétention que la N-acétylglucosamine perméthylée d'une part et l'obtention par GC/MS en mode impact chimique et en mode impact électronique d'un spectre caractéristique, permettent de confirmer l'existence de N-acétylglucosamine intercalaire.

Si l'on se focalise sur le mannose central du noyau pentasaccharidique, celui-ci conduit après perméthylation, méthanolyse et acétylation au 1-O-méthyl 3,6 di-O-acétyl 2,4 di-O-méthyl mannopyrannoside (2,4di-Me-Man) lorsqu'il n'est pas substitué par une N-acétylglucosamine intercalaire alors que dans le cas contraire, il conduit au 1-O-méthyl 3,4,6

**Tableau 17 :** Surfaces des pics de 1-O-méthyl 3,4,6 tri-O-acétyl 2-O-méthyl mannopyrannosides (2-Me-Man) et de 1-O-méthyl 3,6 di-O-acétyl 2,4 di-O-méthyl mannopyrannosides (2,4-di-Me-Man) issues du chromatogramme correspondant à l'analyse des dérivés méthylgalactosides partiellement éthylés.

érythropoïétine humaine recombinante	dérivés mannopyrannosides	surface (x 10 <sup>8</sup> )	pourcentage de N-glycane avec une GlcNAc intercalaire
97P16	2-Me-Man	9,26	76 <sup>a</sup>
	2,4-di-Me-Man	2,96	
97P19	2-Me-Man	3,08	79
	2,4-di-Me-Man	0,82	
97P22	2-Me-Man	8,19	78
	2,4-di-Me-Man	2,26	

<sup>a</sup> cette valeur a été obtenue en effectuant le rapport :  

$$([2\text{-Me-Man}] \times 100) / ([2\text{-Me-Man}] + [2,4\text{-di-Me-Man}])$$



tri-O-acétyl 2-O-méthyl mannopyrannoside (2-Me-Man). Ainsi, en effectuant le rapport des surfaces de pics correspondant à ces 2 dérivés, il est possible de déterminer le pourcentage de structures N-glycanniques possédant une N-acétylglucosamine intercalaire.

Le tableau 17 donne les surfaces des dérivés 2,4di-Me-Man et de 2-Me-Man.

Comme tous les résultats précédents, les pourcentages de N-glycannes possédant une N-acétylglucosamine intercalaire pour les 3 érythropoïétines humaines recombinantes apparaissent très proches les uns des autres. La valeur, voisine de 80%, confirme le haut pourcentage estimé de résidus de N-acétylglucosamine intercalaire dans les N-glycannes des 3 érythropoïétines humaines recombinantes d'après les analyses ES-MS. Nous estimons que le pourcentage de 80% calculé d'après les analyses CPG est beaucoup plus proche de la réalité car il a été obtenu sur l'ensemble des chaînes N-glycanniques en mélange alors que les valeurs estimées d'après les analyses ES-MS le sont sur les 3 sites N-glycanniques pris individuellement.

### 3.5.2. Confirmation de l'hyperfucosylation

#### 3.5.2.1. Principe

Le dernier élément surprenant dans les structures N-glycanniques déduites des analyses ES-MS des glycopeptides des 3 érythropoïétines humaines recombinantes testées, concerne la présence pour certaines d'entre elles, de 2 résidus de fucose. En effet, que ce soit pour l'érythropoïétine humaine urinaire ou les différentes érythropoïétines humaines recombinantes produites dans différentes cellules, un seul résidu de fucose par glycanne a été décrit. Ce résidu est lié sur la N-acétylglucosamine du point d'attache par une liaison  $\alpha$ -(1→6). Lorsqu'un second résidu de fucose est présent, on le trouve très souvent lié à un résidu de N-acétylglucosamine d'une antenne par une liaison  $\alpha$ -(1→3). Ainsi, après perméthylation, méthanolyse et acétylation, 2 dérivés N-acétylglucosaminopyrannosides

**Tableau 18 :** Surfaces des pics de 1-O-méthyl 4,6 di-O-acétyl 3-O-méthyl 2-désoxy (2-N méthyl acétamido) glucosaminopyrannoside (3-Me-GlcNAc), 1-O-méthyl 3,4 di-O-acétyl 6-O-méthyl 2-désoxy (2-N méthyl acétamido) glucosaminopyrannoside (6-Me-GlcNAc), issues du chromatogramme correspondant à l'analyse des dérivés méthylglucosaminopyrannosides partiellement éthylés.

érythropoïétine humaine recombinante	dérivés glucosaminopyrannosides	surface (x 10 <sup>8</sup> )	rapport molaire Fucα-(1→3)/Fucα-(1→6)
97P16	6-Me-GlcNAc	7,15	0,6 <sup>a</sup>
	3-Me-GlcNAc	11,2	
97P19	6-Me-GlcNAc	1,53	0,4
	3-Me-GlcNAc	4,24	
97P22	6-Me-GlcNAc	6,69	0,6
	3-Me-GlcNAc	11,0	

<sup>a</sup> le rapport molaire Fucα-(1→3)/Fucα-(1→6) a été déterminé en calculant le rapport :  
[6-Me-GlcNAc]/[3-Me-GlcNAc]

disubstitués doivent être mis en évidence. Le premier est le 1-O-méthyl 4,6 di-O-acétyl 3-O-méthyl 2-désoxy (2-N méthyl acétamido) glucosaminopyrannoside (GlcNAc du point d'attache substitué en 4 et 6 (3-Me-GlcNAc)) et le 1-O-méthyl 3,4 di-O-acétyl 6-O-méthyl 2-désoxy (2-N méthyl acétamido) glucosaminopyrannoside (GlcNAc d'une antenne substitué en 3 et 4 (6-Me-GlcNAc)). Pour calculer le taux de difucosylation, nous avons procédé d'une façon différente à celle suivie pour les déterminations précédentes. En effet, comme l'attestent les structures glycaniques déduites par ES-MS, toutes les structures N-glycaniques apparaissent monofucosylées (voisin de 100%). Aussi, avons nous considéré, selon les données structurales décrites dans la littérature pour les différentes érythropoïétines humaines recombinantes, que la N-acétylglucosamine du point d'attache était fucosylée à 100% (substitution par une liaison  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6)). Nous avons donc exprimé le taux de 6-Me-GlcNAc (liaison  $\text{Fuc}\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)GlcNAc) par rapport à celui de 3-Me-GlcNAc (fucosylation du point d'attache) que nous avons pris comme référence (1 mole par glycanne).

### 3.5.2.2. Résultats

Le tableau 18 donne la surface des pics de 3-Me-GlcNAc et 6-Me-GlcNAc mesurée pour chacune des 3 érythropoïétines humaines recombinantes.

D'après cette analyse, nous pouvons dire qu'il existe dans les chaînes N-glycaniques des 3 érythropoïétines humaines recombinantes des résidus de N-acétylglucosamine substitués sur l'hydroxyl de leur carbone 3 et d'autres substitués sur l'hydroxyl de leur carbone 6. Compte tenu du taux important de fucose, nous pensons que les 2 substituants des N-acétylglucosamines ci-dessus sont des résidus de fucose. Le taux de difucosylation sur une N-acétylglucosamine d'une antenne est important car, par rapport au taux de fucose lié sur la N-acétylglucosamine du point d'attache, que nous avons pris comme référence (1 mole),

nous tenons un rapport molaire de 0,6 mole pour les érythropoïétines humaines recombinantes 97P16 et 97P22 et de 0,4 mole pour l'érythropoïétine humaine recombinante 97P19.

La présence d'une part d'un résidu de fucose sur une N-acétylglucosamine d'une antenne et d'autre part d'un acide sialique en position terminale d'un résidu de galactose peut définir l'antigène sialyl Lewis<sup>x</sup> dont la structure est la suivante :



Rappelons que pour les N-glycannes des érythropoïétines humaines recombinantes étudiées, des répétitions N-acétyllactosaminiques sont présentes et peuvent conduire à des structures comme celles présentées ci-après :



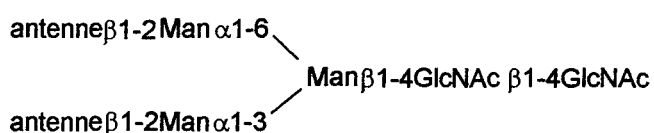
Une telle structure ne correspond pas à un antigène sialyl Lewis<sup>x</sup>, quoique possédant les paramètres structuraux énoncés ci-dessus. Aussi avons nous voulu savoir si des motifs antigéniques sialyl Lewis<sup>x</sup> étaient présents dans les 3 érythropoïétines humaines recombinantes en les mettant en évidence par une technique ELISA grâce à des anticorps anti-sialyl-Lewis<sup>x</sup>. Ce travail a été réalisé au LFB de Lille dans le laboratoire dirigé par le Dr. D. Bourel et a confirmé l'existence de motifs sialyl Lewis<sup>x</sup> dans les 3 érythropoïétines humaines recombinantes testées. Cela étaye notre hypothèse selon laquelle les résidus de N-acétylglucosamine disubstitués, observés lors de l'analyse des méthylglycosides partiellement méthylés et acétylés par CPG, le sont par un résidu de fucose en plus du résidu de galactose. La présence de motifs sialyl Lewis<sup>x</sup> sur des glycannes de l'érythropoïétine

humaine recombinante peut induire, chez une faible proportion de personnes, une réaction immunitaire avec production d'anticorps anti-sialyl-Lewis<sup>x</sup> lors de son utilisation thérapeutique diminuant ainsi considérablement l'efficacité du traitement.

### 3.5.3. Détermination du taux d'antennarisation

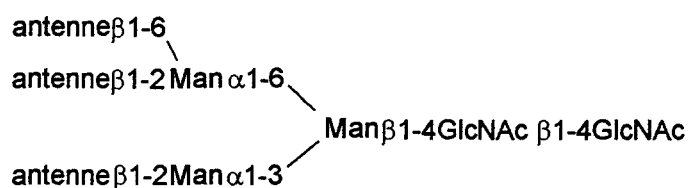
#### 3.5.3.1. Principe

Hormis les deux antennes N-acétyllactosaminiques branchées par une liaison  $\beta$ -(1→2) sur les deux mannoses externes du noyau pentasaccharidique, les autres antennes peuvent être distinguées par la nature de leur liaison sur ces résidus de mannose. Ainsi, la présence d'une seconde antenne sur la branche mannose  $\alpha$ -(1→6) se fait par une liaison  $\beta$ -(1→6) alors qu'une seconde antenne sur le mannose  $\alpha$ -(1→3) se fait par une liaison  $\beta$ -(1→4). Si l'on considère un N-glycane biantenné,



les mannoses des branches  $\alpha$ -(1→6) et  $\alpha$ -(1→3) conduisent, après méthylation, méthanolyse et acétylation, au 1-O-méthyl 2-O-acétyl 3,4,6 tri-O-méthyl mannopyrannoside.

Si l'on considère un N-glycane triantenné (2 antennes sur la branche  $\alpha$ -(1→6)),



**Tableau 19 :** Surfaces des pics des dérivés 1-O-méthyl 2-O-acétyl 3,4,6 tri-O-méthyl mannopyrannoside (3,4,6-tri-Me-Man), 1-O-méthyl 2,6-di-O-acétyl 3,4 di-O-méthyl mannopyrannoside (3,4-di-Me-Man) et 1-O-méthyl 2,4 di-O-acétyl 3,6 di-O-méthyl mannopyrannoside (3,6-di-Me-Man) issues du chromatogramme correspondant à l'analyse des dérivés méthylgalactosides partiellement deutérométhylés.

érythropoïétine humaine recombinante	dérivés méthyl mannopyrannosides	surface des pics	pourcentage de mannose monosubstitué	pourcentage de mannose $\alpha$ -(1→6) disubstitué	pourcentage de mannose $\alpha$ -(1→3) disubstitué
97P16	3,4-di-Me-Man	191.817	19,3 <sup>a</sup>	40,7 <sup>b</sup>	40,0 <sup>c</sup>
	3,6-di-Me-Man	188.504			
	3,4,6-tri-Me-Man	91.010			
97P19	3,4-di-Me-Man	64.445	16,6	39,6	43,8
	3,6-di-Me-Man	71.321			
	3,4,6-tri-Me-Man	26.994			
97P22	3,4-di-Me-Man	200.652	18,7	40,8	40,5
	3,6-di-Me-Man	199.268			
	3,4,6-tri-Me-Man	91.901			

<sup>a</sup> le pourcentage de mannose monoantenné est donné par la formule suivante :  

$$([3,4,6\text{-tri-Me-Man}] \times 100) / ([3,4\text{-di-Me-Man}] + [3,6\text{-di-Me-Man}] + [3,4,6\text{-tri-Me-Man}])$$

<sup>b</sup> le pourcentage de mannose  $\alpha$ -(1→6) diantenné (en 2 et 6) est donné par la formule :  

$$([3,4\text{-di-Me-Man}] \times 100) / ([3,4\text{-di-Me-Man}] + [3,6\text{-di-Me-Man}] + [3,4,6\text{-tri-Me-Man}])$$

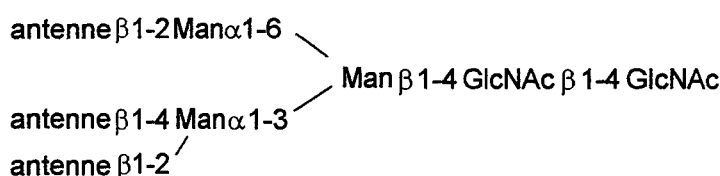
<sup>c</sup> le pourcentage de mannose  $\alpha$ -(1→3) diantenné ( en 2 et 4) est donné par la formule :  

$$([3,6\text{-di-Me-Man}] \times 100) / ([3,4\text{-di-Me-Man}] + [3,6\text{-di-Me-Man}] + [3,4,6\text{-tri-Me-Man}])$$

l'analyse des dérivés méthylmannosides partiellement méthylés et acétylés conduira à 2 types de dérivés :

- i) celui décrit précédemment et qui correspond à un mannose sur lequel une seule antenne N-acétyllactosaminique est présente
- ii) le 1-O-méthyl 2,6 di-O-acétyl 3,4 di-O-méthyl mannopyrannoside.

Dans le cas où la troisième antenne se fixe sur le mannose  $\alpha$ -(1→3) (schéma ci-dessous),



on obtient un nouveau mannopyrannoside partiellement méthylé et acétylé qui est le 1-O-méthyl 2,4-di-O-acétyl 3,6 di-O-méthyl mannopyrannoside.

La quantification des 3 dérivés mannopyrannosides permet de connaître respectivement le pourcentage de mannose substitué par une antenne, le taux de mannose substitué par deux antennes N-acétyllactosaminiques sur la branche  $\alpha$ -(1→6) d'une part et sur la branche  $\alpha$ -(1→3) d'autre part.

### 3.5.3.2. Résultats

Le tableau 19 donne les surfaces de pics correspondants aux 3 dérivés précédents ainsi que leur pourcentage. Pour cette quantification, nous avons utilisé le chromatogramme correspondant à l'analyse des méthylgalactopyrannosides partiellement deuterométhylés. Comme le montre ce tableau, le pourcentage de mannose monosubstitué est inférieur à 20% pour les 3 érythropoïétines humaines recombinantes, le plus faible étant pour l'érythropoïétine humaine recombinante 97P19. Quant aux pourcentages de mannose  $\alpha$ -(1→6) (branche supérieure) disubstitué (en 2 et 6) et de mannose  $\alpha$ -(1→3) (branche inférieure) disubstitué (en 2 et 4), ils sont voisins de 40%. On notera que le pourcentage de

mannose  $\alpha$ -(1→3) disubstitué pour l'érythropoïétine humaine recombinante 97P19 est le plus élevé et qu'il est proche de 44%. Toutefois cette différence ne nous apparaît pas significative. Si, à la vue de ces résultats, il ne peut être conclu, de façon formelle, que 80% des N-glycannes de l'érythropoïétine sont tétraantennés, cette valeur apparaît en bonne adéquation avec les résultats obtenus lors de l'analyse ES-MS des glycopeptides des 3 érythropoïétines humaines recombinantes et confirme leur haut degré d'antennarisation qui, du reste, est l'une des principales caractéristiques structurales de l'érythropoïétine humaine urinaire.

### 3.5.4. Détermination du pourcentage de répétitions *N*-acétyllactosaminiques

#### 3.5.4.1. Principe

Dans l'érythropoïétine humaine urinaire et les différentes érythropoïétines humaines recombinantes produites par les cellules CHO et BHK, le résidu de galactose en position terminale d'une antenne peut être substitué soit par un acide sialique (en  $\alpha$ -(2→3) et  $\alpha$ -(2→6) pour l'érythropoïétine humaine urinaire) soit par un résidu de N-acétylglucosamine (en  $\beta$ -(1→3) ou  $\beta$ -(1→6)) qui est ultérieurement galactosylé pour former une répétition N-acétyllactosaminique. Grâce à la stratégie que nous avons mise au point (Cointe *et al.*, sous presse), il est possible de distinguer un galactose substitué sur l'hydroxyl de son carbone 3 par un acide sialique d'un galactose substitué sur la même position par un résidu de N-acétylglucosamine. Dans le premier cas on génère après méthylation des N-glycannes, désialylation sélective, éthylation, méthanolyse et acétylation, le 1-O-méthyl-3-O-éthyl-2,4,6 tri-O-méthyl galactopyrannoside alors que dans le second cas on génère le 1-O-méthyl 3-O-acétyl 2,4,6 tri-O-méthyl galactopyrannoside. Dans le cas où un résidu de galactose terminal



**Tableau 20 :** Surfaces des pics de 1-O-méthyl 3-O-éthyl 2,4,6 tri-O-méthyl galactopyrannoside (3-Et-Gal), 1-O-méthyl 6-O-éthyl 2,3,4 tri-O-méthyl galactopyrannoside (6-Et-Gal), 1-O-méthyl 3-O-acétyl 2,4,6 tri-O-méthyl galactopyrannoside (2,4,6-tri-Me-Gal) et le 1-O-méthyl 2,3,4,6 tétra-O-méthyl galactopyrannoside (PM-Gal) issues du chromatogramme correspondant à l'analyse des dérivés méthylgalactopyrannosides partiellement éthylés.

érythropoïétine humaine recombinante	dérivés galactopyrannosides	surface (x 10 <sup>5</sup> )	pourcentage de répétition LacNAc
97P16	3-Et-Gal	2,16	30,8 <sup>a</sup>
	6-Et-Gal	3,68	
	2,4,6-tri-Me-Gal	3,16	
	PM-Gal	1,27	
97P19	3-Et-Gal	1,06	29,3
	6-Et-Gal	1,88	
	2,4,6-tri-Me-Gal	1,44	
	PM-Gal	0,54	
97P22	3-Et-Gal	2,64	32,6
	6-Et-Gal	4,4	
	2,4,6-tri-Me-Gal	4,09	
	PM-Gal	1,40	

<sup>a</sup> cette valeur est obtenue en calculant le rapport :  

$$([2,4,6\text{-tri-Me-Gal}] \times 100) / ([2,4,6\text{-tri-Me-Gal}] + [3\text{-Et-Gal}] + [6\text{-Et-Gal}] + [\text{PM-Gal}])$$

est substitué par un acide sialique en  $\alpha$ -(2→6) on génère le 1-O-méthyl 6-O-éthyl 2,3,4 tri-O-méthyl galactopyrannoside (6-Et-Gal). Enfin, un galactose non substitué, conduit au 1-O-méthyl 2,3,4,6 tétra-O-méthyl galactopyrannoside (galactose perméthylé). Ainsi, le rapport du taux de 2,4,6 tri-O-méthyl galactopyrannoside sur le nombre total de galactose par N-glycane donne le pourcentage de galactose substitué par une répétition N-acétyllactosaminique.

#### **3.5.4.2. Résultats**

Le tableau 20 rassemble les surfaces des 4 dérivés méthyl galactopyrannosides cités ci-dessus pour les 3 érythropoïétines humaines recombinantes. Le pourcentage de galactose substitué par une répétition N-acétyllactosaminique apparaît similaire pour les 3 érythropoïétines humaines recombinantes. Ce taux, voisin de 31%, atteste du grand nombre de répétitions N-acétyllactosaminiques par N-glycane et confirme le nombre important de N-glycannes possédant des répétitions N-acétyllactosaminiques décrit lors des analyses ES-MS précédentes.

# **DISCUSSION**

## **Analyse comparative des structures glycaniques des trois lots par rapport à celle décrite dans la littérature**

L'analyse de nos résultats sur la structure des glycanes de l'érythropoïétine humaine recombinante produite par le LFB révèle les points majeurs suivants :

- i) une hyperfucosylation,
- ii) la présence d'un résidu de N-acétylglucosamine intercalaire sur la majorité des structures N-glycaniques,
- iii) la présence d'acides sialiques liés en  $\alpha$ -(2→3) et  $\alpha$ -(2→6),
- iv) un taux d'antennarisation et/ou de répétitions N-acétyllactosaminiques élevé.

Nous allons développer ces quatre points de façon plus détaillée.

### **i) L'hyperfucosylation**

Les résultats de composition molaire en monosaccharides de la glycoprotéine montrent un rapport molaire en fucose supérieur à 1 mais inférieur à 2.

On peut en déduire la présence de 1 à 2 fucose(s) par structure N-glycanique présente sur chacun des trois sites de N-glycosylation. Ce résultat est différent de ce qui a été décrit pour l'érythropoïétine humaine urinaire et l'érythropoïétine humaine recombinante produite par les cellules CHO et BHK : la majorité des structures ne possèdent qu'un seul fucose sur le résidu de N-acétylglucosamine du point d'attache et les autres n'en ont pas du tout.

L'analyse des dérivés méthylés a confirmé la présence de 1 à 2 fucose(s) par N-glycane. Le premier fucose est lié sur le résidu de N-acétylglucosamine du point d'attache par une liaison  $\alpha$ -(1→6) comme pour l'érythropoïétine urinaire ou recombinante alors que le second, lorsqu'il est présent, serait lié par une liaison  $\alpha$ -(1→3) à un résidu de N-

acétylglucosamine appartenant à une antenne ou à une répétition N-acétyllactosaminique. Dans ce cas, le motif formé correspond à l'antigène Lewis<sup>x</sup> et sialyl Lewis<sup>x</sup> si le galactose est substitué par un résidu d'acide sialique par l'intermédiaire d'une liaison  $\alpha$ -(2→3).

Des dosages ELISA réalisés avec un anticorps anti-CD 15 qui reconnaît spécifiquement le motif sialyl Le<sup>x</sup> nous ont permis de confirmer la présence de cet antigène au sein des structures glycaniques des sites de N-glycosylation de l'érythropoïétine humaine recombinante produite par le LFB.

Lorsque les glycanes possèdent une fucosylation anormalement élevée, on parle d'hyperfucosylation. Cette hyperfucosylation apparaît lors des processus inflammatoires et a été décrite dans des cas de cirrhoses et d'arthrite rhumatoïde. En effet, l'étude de la glycosylation de l' $\alpha$ 1-acide glycoprotéine provenant du sérum de patients atteints de ces maladies a montré une augmentation du taux de fucose c'est à dire du taux d'expression de sialyl Le<sup>x</sup> sur les N-glycanes (Brinkman-Van Der Linden *et al.*, 1996 ; Van Dijk *et al.*, 1995). L' $\alpha$ 1- acide glycoprotéine est une glycoprotéine sérique surexprimée en phase aigüe de l'inflammation possédant cinq sites de N-glycosylation constitués de structures bi, tri et tétraantennées. La concentration sérique de cette protéine augmente de 2 à 5 fois lors de la phase aigüe de la réponse inflammatoire. L'étude d'autres protéines de l'inflammation comme l' $\alpha$ 1-protéinase inhibiteur ou l' $\alpha$ 1-antichymotrypsine ont confirmé ces altérations de glycosylation en réponse à une inflammation (Mackiewicz et Mackiewicz, 1995). En possédant le motif sialyl Le<sup>x</sup>, ces glycoprotéines seront reconnues par les sélectines pour être dirigées comme les leucocytes vers le lieu de l'inflammation.

On notera que les cellules cancéreuses « profitent » de ce système pour métastaser. En effet, l'expression à leur surface de l'antigène sialyl Le<sup>x</sup> leur permettra de suivre le même chemin que les neutrophiles et les protéines de l'inflammation et ainsi envahir un nouveau tissu.

Il est à signaler qu'une faible proportion d'individu possède des anticorps anti-sialyl-Lewis<sup>X</sup>. Une injection d'une érythropoïétine humaine recombinante possédant des motifs sialyl Lewis<sup>X</sup> chez ces sujets induirait une réponse immunitaire.

ii) Le résidu de N-acétylglucosamine intercalaire

La composition molaire en monosaccharides présentée page 64 montre un taux de N-acétylglucosamine élevé. Le taux de galactose étant de six, six N-acétylglucosamines sont liées à six galactoses pour les antennes ou répétitions N-acétyllactosaminiques. Il reste deux résidus de N-acétylglucosamine dont un correspond à celui du noyau pentasaccharidique. Celui lié à l'Asparagine n'étant pas détecté, il reste un résidu de N-acétylglucosamine en trop.

Les résultats des analyses de méthylation par GC/MS ont mis en évidence la présence de 3, 4,6-tri-O-acétyl-2-O-méthyl méthylmannopyrannoside (mannose central) ainsi qu'un dérivé perméthylé de la N-acétylglucosamine.

Les mesures de masses moléculaires des glycoformes par spectrométrie de masse électrospray ont confirmé la présence de cette N-acétylglucosamine supplémentaire dont on pense qu'elle correspondrait à un résidu de N-acétylglucosamine intercalaire.

Ce résidu est ajouté grâce à l'action de la N-acétylglucosaminyltransférase III, enzyme clé dans la biosynthèse des N-glycannes. En effet, en ajoutant un résidu de N-acétylglucosamine, cette enzyme empêche l' $\alpha$ -mannosidase II, la N-acétylglucosaminyltransférase II, la N-acétylglucosaminyltransférase IV, la N-acétylglucosaminyltransférase V et l' $\alpha$ -(1→6) fucosyltransférase d'agir. Le fait d'avoir décrit uniquement des structures de type complexe signifie que la N-acétylglucosaminyltransférase III est la dernière enzyme de cette famille à agir.

Ce résidu de N-acétylglucosamine intercalaire est un marqueur de différenciation cellulaire et un marqueur de cancérisation chez l'homme adulte. On constate en effet l'induction de

l'activité de la N-acétylglucosaminyltransférase III dans la carcinogénèse du foie (Brockhausen *et al.*, 1988 ; Narasimhan *et al.*, 1988) et une augmentation de son activité lors de cirrhose (Ishibashi *et al.*, 1989) ou d'arthrite rhumatoïde (Youings *et al.*, 1996). Motoyoshi *et al.* (1990) ont par ailleurs montré l'apparition de résidu de N-acétylglucosamine intercalaire sur les oligosaccharides des membranes cellulaires des lymphocytes humains pendant leur différenciation.

Ce résidu de N-acétylglucosamine intercalaire n'a pas été décrit pour l'érythropoïétine humaine urinaire ni pour l'érythropoïétine humaine recombinante produite par les cellules CHO et BHK.

### iii) La sialylation

La composition molaire en monosaccharides indique la présence moyenne de trois acides sialiques par structure N-glycannique.

Des résultats, non présentés dans ce mémoire, obtenus par FPLC sur une colonne échangeuse d'anions (MonoQ) ont révélé la présence majoritaire de structures tétrasialylées mais aussi de structures trisialylées, bisialylées et monosialylées.

Les analyses des dérivés méthylés et éthylés ou deutérométhylés ont permis de déterminer un taux de sialylation d'environ 80% pour l'érythropoïétine humaine recombinante produite par le LFB, ce qui est conforme à ce qui est décrit pour l'érythropoïétine humaine urinaire ou recombinante.

L'analyse de la nature des liaisons des acides sialiques a montré qu'environ 60% d'entre eux étaient liés au galactose par une liaison  $\alpha$ -(2→6) et 40% par une liaison  $\alpha$ -(2→3).

Il s'agit là d'un point marquant une différence avec l'érythropoïétine humaine recombinante produite aussi bien par les cellules CHO que par les cellules BHK : les acides sialiques sont tous liés au galactose par une liaison  $\alpha$ -(2→3). En effet, l' $\alpha$ -(2→6) sialyltransférase est absente de ces cellules.

Par contre, l'érythropoïétine humaine recombinante produite par le LFB est semblable à l'érythropoïétine humaine urinaire d'un point de vue de la sialylation puisque la nature des liaisons est de type  $\alpha$ -(2→3) ou  $\alpha$ -(2→6). Mais, les proportions  $\alpha$ -(2→3)/ $\alpha$ -(2→6) sont inversées : 80 :20 selon Sasaki *et al.* (1987) et 60 :40 selon Takeuchi *et al.* (1988) contre 40 :60 dans notre cas.

Quant à la nature même des acides sialiques, l'analyse qualitative a révélé la présence d'acide N-acétylneuraminique (99%) et de moins de 1% d'acide N-glycolylneuraminique. La trop faible quantité de matériel correspondant vraisemblablement à l'acide N-glycolylneuraminique n'a pas permis de confirmer la nature de ce dernier par spectrométrie de masse. Cependant, des co-injections des acides sialiques libérés de l'érythropoïétine humaine recombinante et du témoin de NeuGc ont montré une co-élution des deux produits. En conséquence, il s'agit vraisemblablement de l'acide N-glycolylneuraminique.

Hokke *et al.* (1990) ont constaté la présence de NeuGc à raison de 3% dans l'érythropoïétine humaine recombinante produite par les cellules CHO. La présence de NeuGc a été décrite également dans l'érythropoïétine produite par les cellules BHK (Nimtz *et al.*, 1993). Ce monosaccharide est absent chez l'homme sain qui est capable de produire l'anticorps de Hanganutziu-Deicher reconnaissant spécifiquement l'acide N-glycolylneuraminique lié en  $\alpha$ -(2→3) au galactose terminal.

L'utilisation thérapeutique de l'érythropoïétine produite par les cellules CHO pourrait donc induire une réaction immunitaire chez l'homme. Selon Noguchi *et al.* (1995), la quantité d'acide N-glycolylneuraminique n'est pas suffisamment grande pour stimuler la production d'anticorps chez le poulet.

Toutefois, certains auteurs (Peces *et al.*, 1996, Casadevall *et al.*, 1996) ont décrit une production d'anticorps anti-érythropoïétine humaine recombinante dans quelques cas isolés rendant le traitement inefficace chez ces patients.



## iv) Le degré d'antennarité et/ou de répétitions N-acétyllactosaminiques élevé

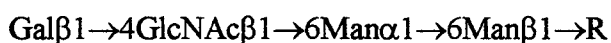
La composition molaire en monosaccharides révèle un taux d'antennarisation élevé.

Les résultats obtenus après analyse des dérivés méthylés ont mis en évidence qu'environ 40% des antennes étaient liées par une liaison  $\beta$ -(1→4) sur le mannose de la branche  $\alpha$ -(1→3) ou/et  $\alpha$ -(1→6) et 40% par une liaison  $\beta$ -(1→6) sur le mannose de la branche  $\alpha$ -(1→6). Ces antennes sont celles présentes sur les structures de type triantenné, tétraantenné et pentaantenné. Ces chiffres indiquent un taux élevé d'antennarisation conforme à ce qui est décrit dans le cas de l'érythropoïétine humaine urinaire et recombinante.

Le taux de répétitions N-acétyllactosaminiques calculé à partir des résultats GC/MS est d'environ 30% c'est à dire que 30% des résidus de galactose sont substitués en position 3 par une répétition de N-acétyllactosamine. Cette substitution correspond à l'antigène i à l'inverse de la substitution en  $\beta$ -(1→6) qui correspond à l'antigène I. La  $\beta$ -(1→3)-N-acétylglucosaminyltransférase (iGnT) est essentielle à la formation des chaînes i (Sasaki *et al.*, 1997). Ces antigènes i et I sont des marqueurs de la différenciation : chez le foetus, on ne retrouve que des motifs i alors que chez l'adulte les érythrocytes expriment à leur surface les deux motifs i et I.

Dans les granulocytes, monocytes et lymphocytes T, ces chaînes polylactosaminiques portent le motif sialyl Le<sup>x</sup> (Sasaki *et al.*, 1997).

Par ailleurs, il a été démontré que l'activité de la N-acétylglucosaminyltransférase V et de la  $\beta$ -(1→3)-N-acétylglucosaminyltransférase est beaucoup plus élevée dans les cellules tumorales que chez leurs équivalents normaux (Sasaki *et al.*, 1997). Et, l'affinité de la  $\beta$ -(1→3)-N-acétylglucosaminyltransférase est plus élevée pour la chaîne :



formée par la N-acétylglucosaminyltransférase V comme accepteur (Sasaki *et al.*, 1997).

Cet antigène i n'a pas été retrouvé au sein des structures décrites pour l'érythropoïétine humaine urinaire et l'érythropoïétine humaine recombinante produite par les cellules CHO ou BHK.

Rappelons enfin que les travaux de Takeuchi *et al.* (1989) ont montré que l'activité biologique d'une érythropoïétine dépendait de son taux d'antennarité puisque l'activité d'une érythropoïétine riche en structures tétraantennées (epo-tétra) est bien supérieure *in vivo* à celle d'une érythropoïétine riche en structures biantennées (epo-bi). On peut donc estimer que les 3 érythropoïétines humaines recombinantes produites par le LFB possèdent une activité biologique *in vivo* aussi bonne que la naturelle, voire meilleure puisqu'elles sont toutes les trois fortement antennées.

## CONCLUSION

Ces résultats montrent qu'il ne suffit pas de maîtriser les outils de la biologie moléculaire et de la culture cellulaire pour produire une glycoprotéine recombinante semblable à son équivalent naturel humain. Le potentiel enzymatique de la glycosylation de la cellule joue un rôle très important et c'est lui qui déterminera à travers le jeu de régulations inconnues la glycosylation de la glycoprotéine recombinante.

De plus, il est nécessaire dans le cas de la production de glycoprotéines recombinantes à usage thérapeutique de vérifier leur glycosylation avant de pouvoir les utiliser chez l'homme.

# **CONCLUSION GENERALE**

Les travaux présentés dans ce mémoire permettent de tirer plusieurs conclusions concernant la glycosylation des 3 érythropoïétines humaines recombinantes étudiées.

Le taux de sialylation trouvé pour nos 3 érythropoïétines humaines recombinantes est comparable à celui publié dans la littérature pour les différentes érythropoïétines étudiées. L'érythropoïétine 97P19 apparaît la plus fortement sialylée, suivie des érythropoïétines 97P22 et 97P16, que ce soit au regard de la composition en monosaccharides ou du pourcentage de sialylation déterminé en utilisant notre stratégie. Toutefois, ces différences sont minimes.

Pour la fucosylation, l'élément marquant concerne la présence, dans certains glycanes, de 2 résidus de fucose. Une telle caractéristique n'avait jamais été rapportée pour une érythropoïétine. Ce résultat est étayé par l'analyse de la composition en monosaccharides, la présence de résidus de N-acétylglucosamine disubstitués (analyse de méthylation) et l'analyse des glycopeptides par ES-MS. Des 3 érythropoïétines, l'érythropoïétine 97P19 est la moins fucosylée.

La glycosylation des 4 sites apparaît identique dans les 3 cas, excepté pour le site de O-glycosylation de l'érythropoïétine 97P16. En effet, nous avons observé la présence de peptides dont la sérine 126 ne portait pas de glycanes. Ce résultat est confirmé par les analyses de la composition en monosaccharides.

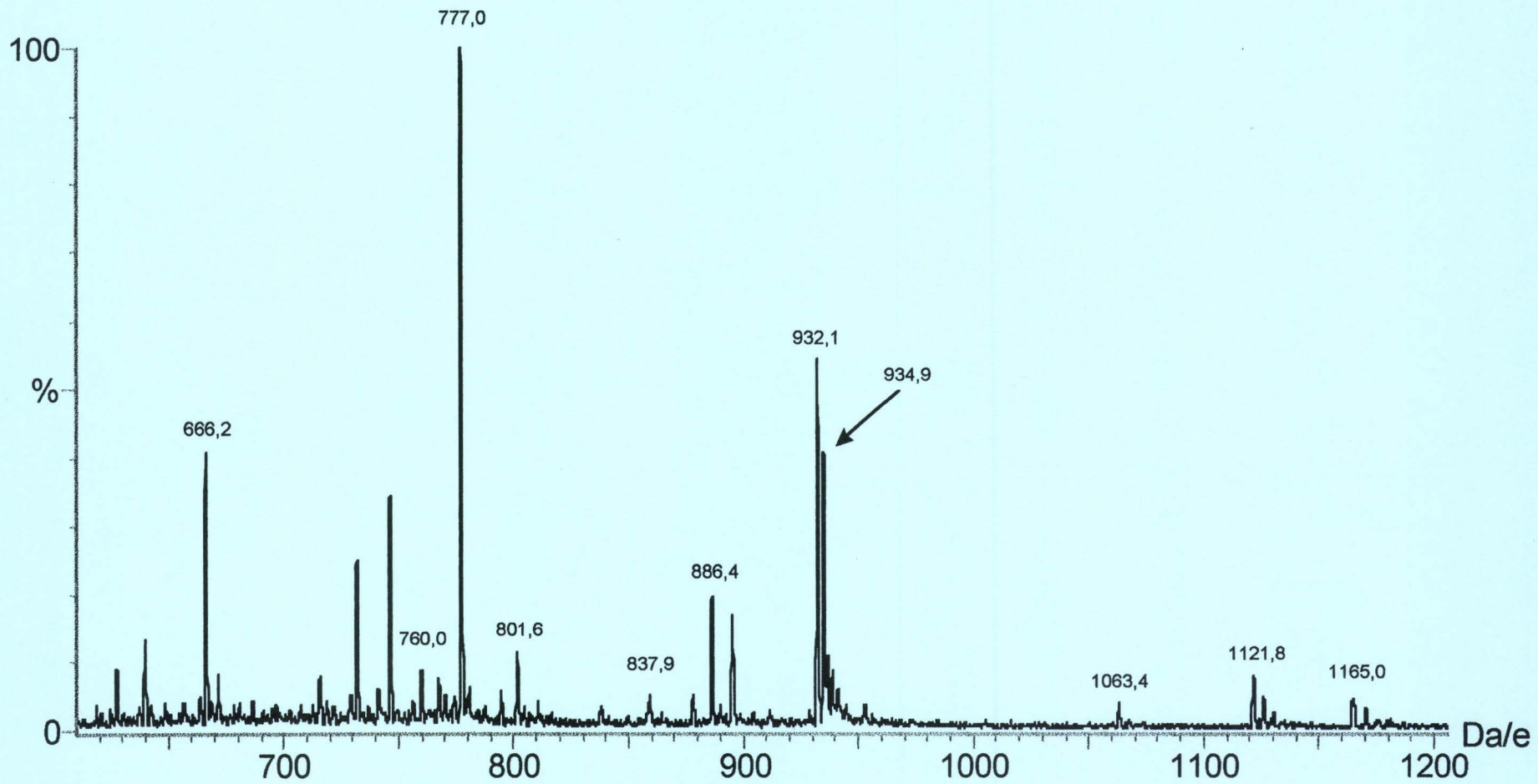
Dans le cas particulier de la N-glycosylation, nous n'observons pas de différences significatives entre les pourcentages des différentes structures glycaniques (bi-, tri- et tétra-antennées) déduites par ES-MS. Le pourcentage de structures bi- et tri-antennées apparaît le plus élevé dans le site de glycosylation Asn-24 alors que les sites 38 et 83 portent majoritairement des structures glycaniques tétraantennées (*N.B.* : on ne trouve que des glycanes tétraantennés pour le site de glycosylation Asn-83). Un tel profil de glycosylation

a été retrouvé dans l'érythropoïétine humaine urinaire ainsi que dans les érythropoïétines humaines recombinantes produites dans des cellules CHO ou BHK.

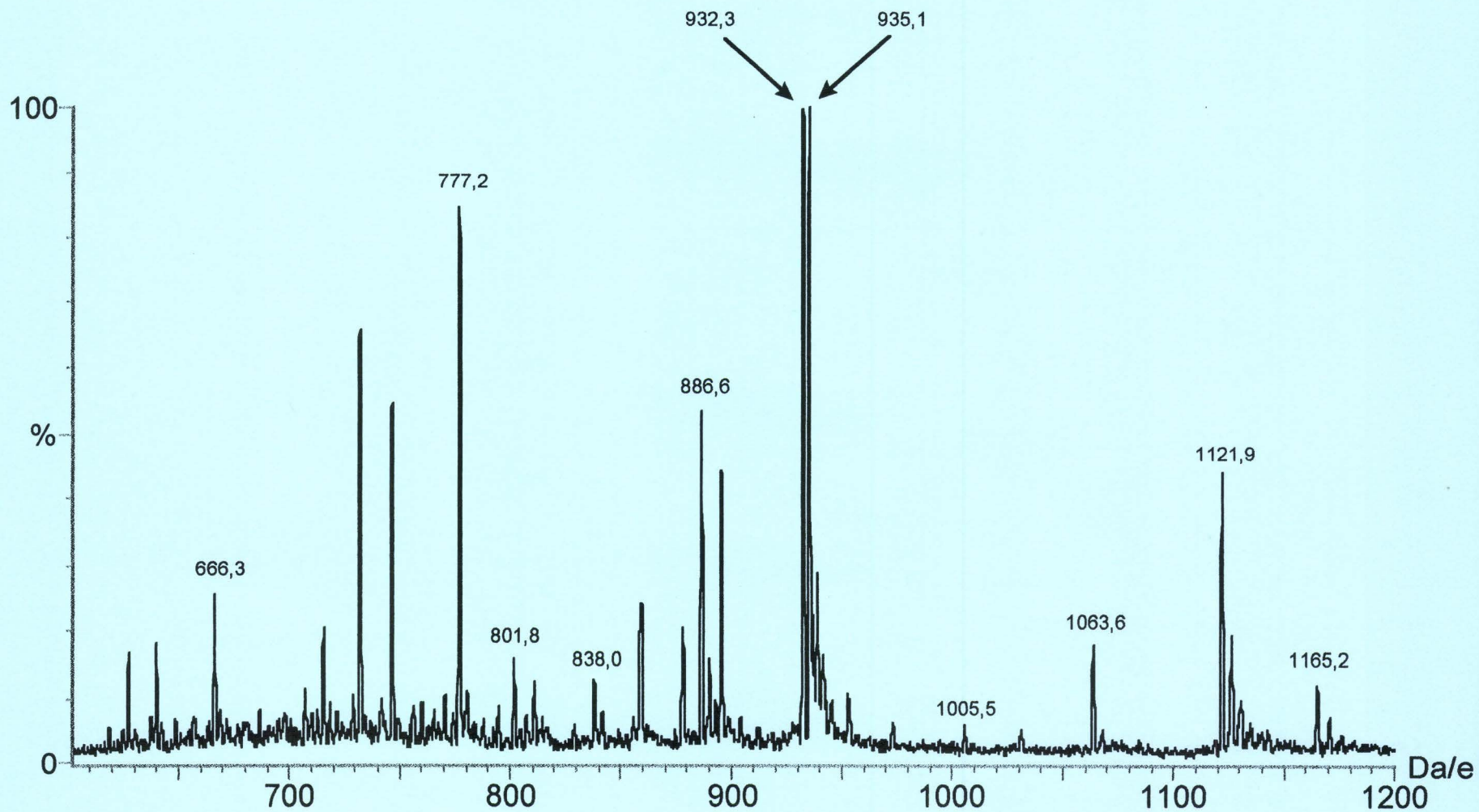
La comparaison du profil de glycosylation de nos 3 érythropoïétines montre que l'érythropoïétine 97P22 présente le pourcentage de glycosylation le plus élevé (composition molaire), le taux de répétitions N-acétyllactosaminiques et de N-acétylglucosamine intercalaire également le plus élevé (traduit à la fois par la composition en monosaccharides, les analyses par méthylation et par ES-MS). Quant au taux de sialylation et de fucosylation, il est légèrement inférieur à celui de l'érythropoïétine 97P16 qui est la plus sialylée et fucosylée. Enfin, cette érythropoïétine 97P22 se distingue également des deux autres par un taux de sulfatation ou phosphorylation très faible.

Les quelques différences observées entre ces 3 érythropoïétines humaines recombinantes ne peuvent pas être imputées au mode de culture puisque le profil de glycosylation des érythropoïétines 97P19 et 97P22, produites en cytotuteur en mode perfusion, est légèrement différent. De plus, le profil de glycosylation de l'érythropoïétine 97P16, produite en cytotuteur en mode discontinu de type « batch », est très similaire à celui de l'érythropoïétine 97P19. Un début d'explication pourrait résider dans le fait que l'érythropoïétine 97P22 est la seule à avoir été produite en absence de sérum de veau foetal alors que les deux autres, qui sont très similaires entre elles, l'ont été en présence de sérum de veau foetal. D'une façon surprenante, le taux de glycosylation déterminé à partir de nos 3 érythropoïétines (30%) est inférieur à celui décrit pour les différentes érythropoïétines étudiées (35-40%) et cela en dépit d'une antennarité normale, de la présence d'un résidu de N-acétylglucosamine intercalaire dans environ 90% des cas, de la présence de 2 résidus de fucose (dans environ 20% des cas) et d'un nombre élevé de répétitions N-acétyllactosaminiques. Toutefois, nous ne disposons pas d'éléments de comparaison pour discuter ce résultat.

# **ANNEXES**

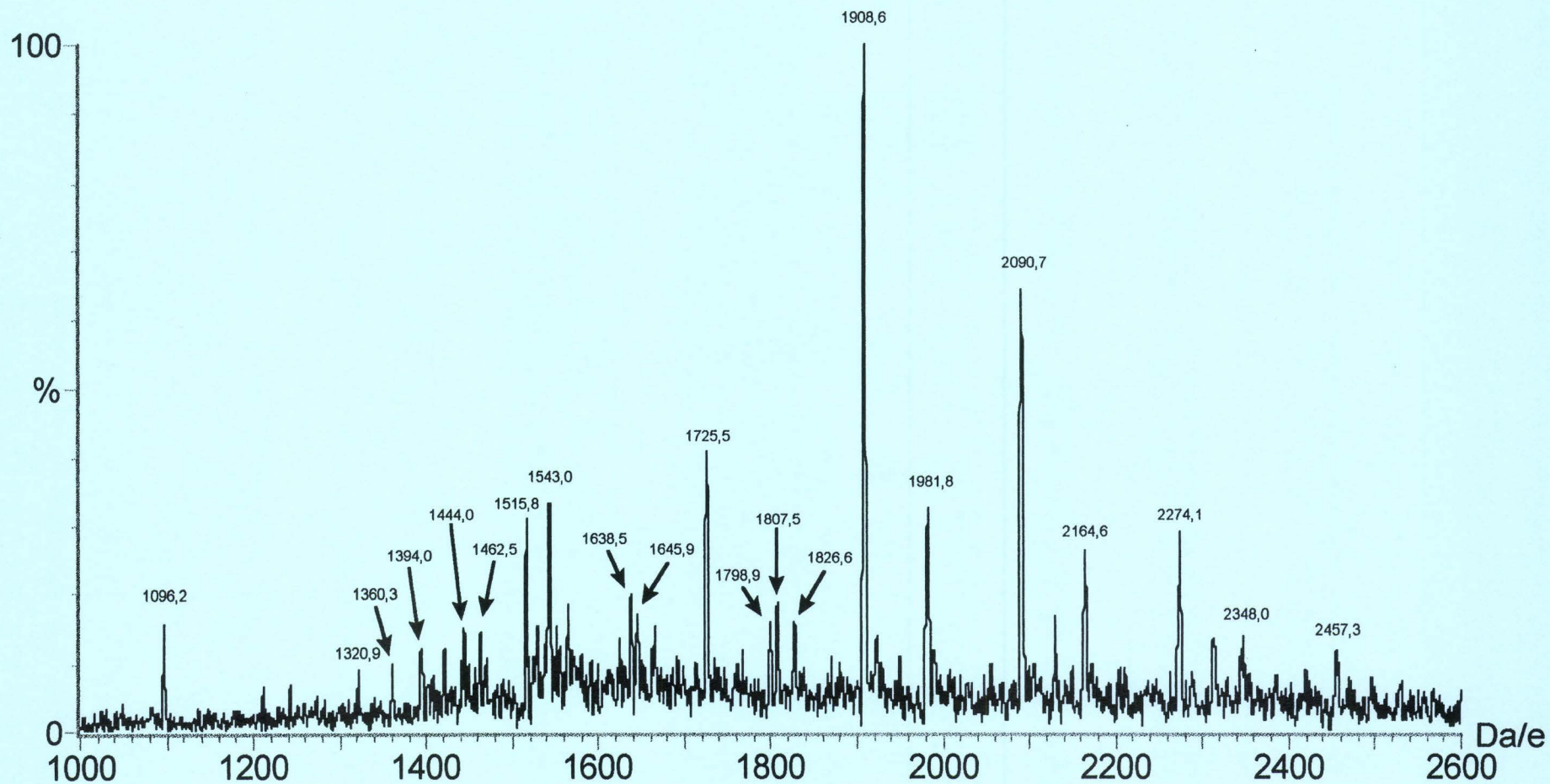


**Annexe 1 :** Spectre de masse correspondant aux peptides et glycopeptides natifs du site de glycosylation Ser-126 de l'érythropoïétine humaine recombinante 97P16 obtenu par ES-MS.



**Annexe 2 :** Spectre de masse correspondant aux peptides et glycopeptides natifs du site de glycosylation Ser-126 de l'érythropoïétine humaine recombinante 97P22 obtenu par ES-MS.





**Annexe 3 :** Spectre de masse correspondant aux N-glycopeptides désialylés du pic 4 du site de glycosylation Asn-24 de l'érythropoïétine humaine recombinante 97P16 obtenu par LC-MS.

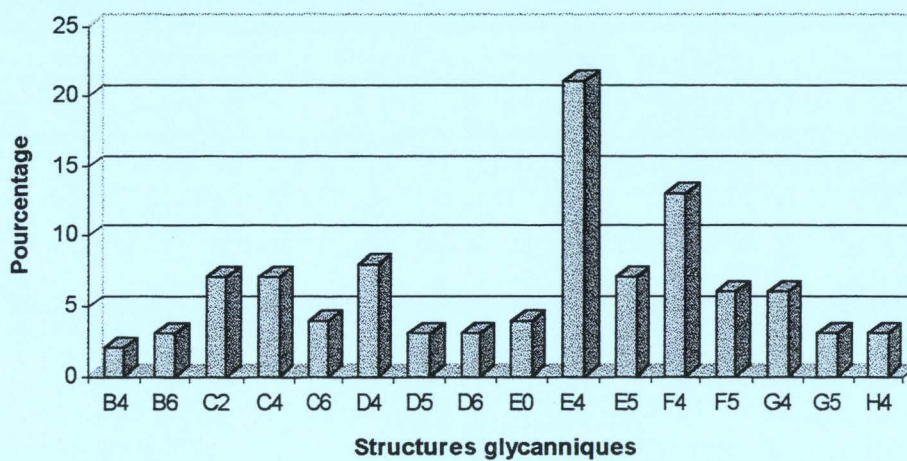
**Annexe 4 :** Structures glycaniques déduites d'après les ions de masse  $m/z$  observés sur le spectre de masse (Annexe 3) correspondant au pic 4 du site de glycosylation Asn-24 de l'érythropoïétine humaine recombinante 97P16.

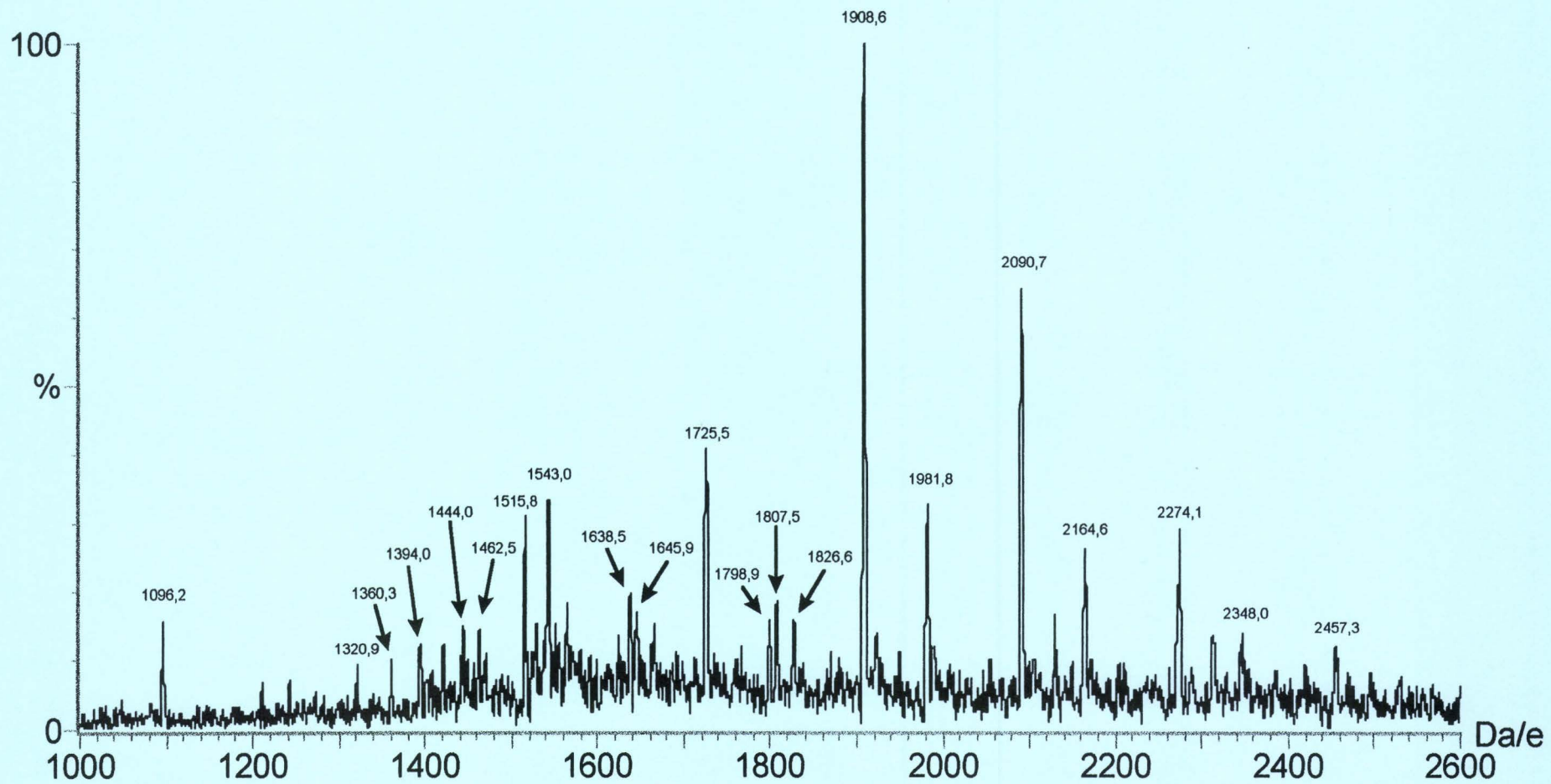
masse observée	état de charge	masse déconvoluée	structure glycanique déduite	masse théorique	pourcentage
1360,3	+2	2718,6	B4 <sup>a</sup>	2719,7 <sup>b</sup>	2
1462,5	+2	2923,0	B6	2922,9	3
1515,8	+2	3029,6	C2	3028,0	7
1543,0	+2	3084,0	C4	3085,0	7
1645,9	+2	3289,2	C6	3288,2	4
1096,2	+3				
1725,5	+2	3449,0	D4	3450,4	8
1798,9	+2	3595,8	D5	3596,5	3
1826,6	+2	3651,2	D6	3653,6	3
1807,5	+2	3613,0	E0	3612,5	4
1908,6	+2	3815,2	E4	3815,7	21
1981,8	+2	3960,7	E5	3961,8	7
1320,9	+3				
2090,7	+2	4179,2	F4	4181,0	13
1394,0	+3				
2164,6	+2	4328,1	F5	4327,2	6
1444,0	+3				
2274,1	+2	4545,3	G4	4546,4	6
1515,8	+3				
2348,0	+2	4694,0	G5	4692,5	3
2457,3	+2	4912,6	H4	4911,7	3
1638,5	+3				

<sup>a</sup> d'après la nomenclature du tableau 6 page 102.

<sup>b</sup> la masse théorique du glycopeptide a été obtenue en ajoutant à la masse théorique du peptide (1112,2 Da) celle du glycanne et en retranchant la masse correspondant à l'élimination d'une molécule d'eau.

**Annexe 5 :** Histogramme présentant le pourcentage de chaque structure glycanique déduite pour le pic 4 du site Asn-24 de l'érythropoïétine humaine recombinante 97P16.





**Annexe 6 :** Spectre de masse correspondant aux N-glycopeptides désialylés du pic 4 du site de glycosylation Asn-24 de l'érythropoïétine humaine recombinante 97P22 obtenu par LC-MS.

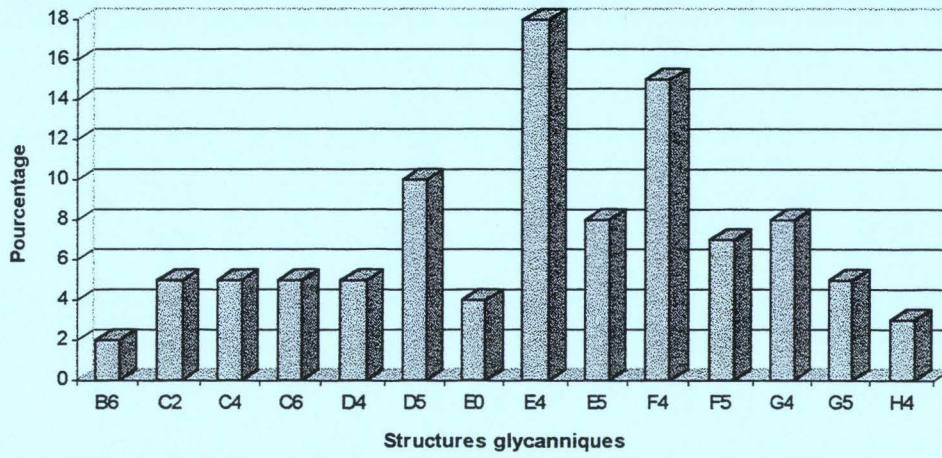
**Annexe 7 :** Structures glycaniques déduites d'après les ions de masse  $m/z$  observés sur le spectre de masse (Annexe 6) correspondant au pic 4 du site de glycosylation Asn-24 de l'érythropoïétine humaine recombinante 97P22.

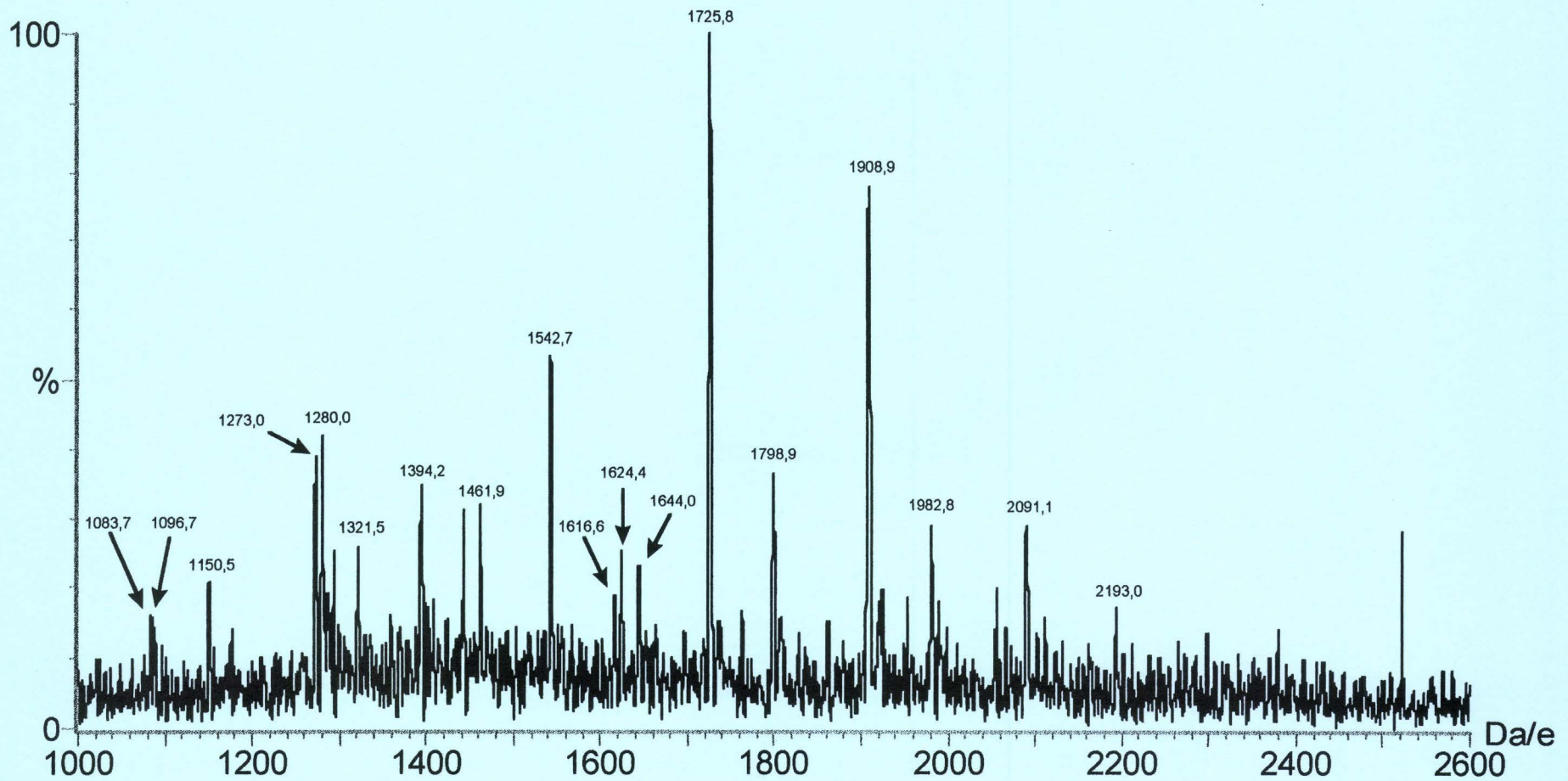
masse observée	état de charge	masse déconvoluée	structure glycanique déduite	masse théorique	pourcentage
1461,9	+2	2921,8	B6 <sup>a</sup>	2922,9 <sup>b</sup>	2
1515,6	+2	3029,2	C2	3028,0	5
1543,9	+2	3085,8	C4	3085,0	5
1645,1	+2	3287,2	C6	3288,2	5
1096,4	+3				
1726,2	+2	3595,0	D4	3450,4	5
1798,5	+2	3450,4	D5	3596,5	10
1807,4	+2	3612,8	E0	3612,5	4
1908,6	+2	3815,5	E4	3815,7	18
1272,9	+3				
1981,0	+2	3960,0	E5	3961,8	8
2090,6	+2	4178,8	F4	4181,0	15
1393,8	+3				
2164,1	+2	4325,7	F5	4327,2	7
1442,7	+3				
2273,9	+2	4544,8	G4	4546,4	8
1515,6	+3				
2347,6	+2	4692,0	G5	4692,5	5
1564,6	+3				
2457,2	+2	4911,1	H4	4911,7	3
1637,6	+3				

<sup>a</sup> d'après la nomenclature du tableau 6 page 102.

<sup>b</sup> la masse théorique du glycopeptide a été obtenue en ajoutant à la masse théorique du peptide (1112,2 Da) celle du glycanne et en retranchant la masse correspondant à l'élimination d'une molécule d'eau.

**Annexe 8 :** Histogramme présentant le pourcentage de chaque structure glycanne déduite pour le pic 4 du site Asn-24 de l'érythropoïétine humaine recombinante 97P22.





**Annexe 9 :** Spectre de masse correspondant aux N-glycopeptides désialylés du pic 5 du site de glycosylation Asn-24 de l'érythropoïétine humaine recombinante 97P16 obtenu par LC-MS.

**Annexe 10 :** Structures glycaniques déduites d'après les ions de masse  $m/z$  observés sur le spectre de masse (Annexe 9) correspondant au pic 5 du site de glycosylation Asn-24 de l'érythropoïétine humaine recombinante 97P16.

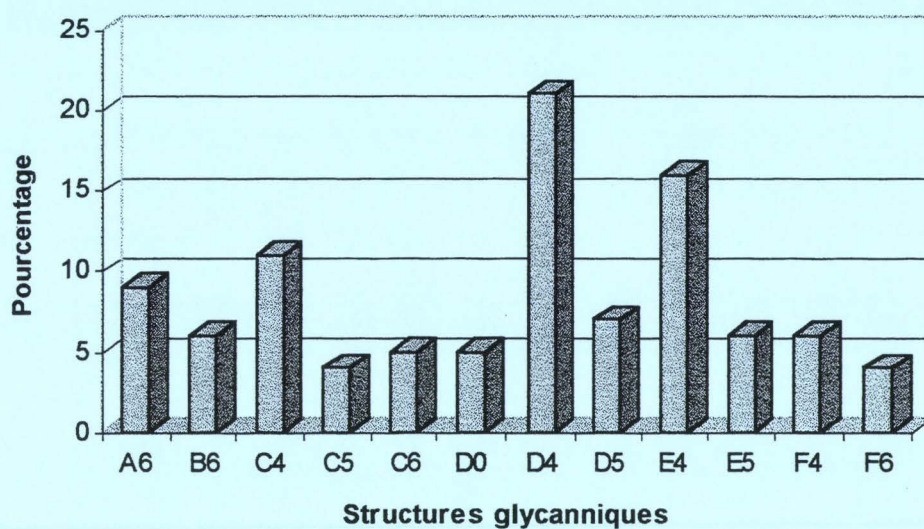
masse observée	état de charge	masse déconvoluée	structure glycanique déduite	masse théorique	pourcentage
1280,0	+2	2558,0	A6 <sup>a</sup>	2557,5 <sup>b</sup>	9
1461,9	+2	2921,8	B6	2922,9	6
1542,7	+2	3083,4	C4	3085,0	11
1616,6	+2	3231,2	C5	3231,2	4
1644,0	+2	3286,6	C6	3288,2	5
1096,7	+3				
1624,4	+2	3247,5	D0	3247,2	5
1083,7	+3				
1725,8	+2	3449,1	D4	3450,4	21
1150,5	+3				
1798,9	+2	3595,8	D5	3596,5	7
1908,9	+2	3815,9	E4	3815,7	16
1273,0	+3				
1982,8	+2	3962,5	E5	3961,8	6
1321,5	+3				
2091,1	+2	4179,9	F4	4181,0	6
1394,2	+3				
2193,0	+2	4383,3	F6	4384,2	4
1461,9	+3				

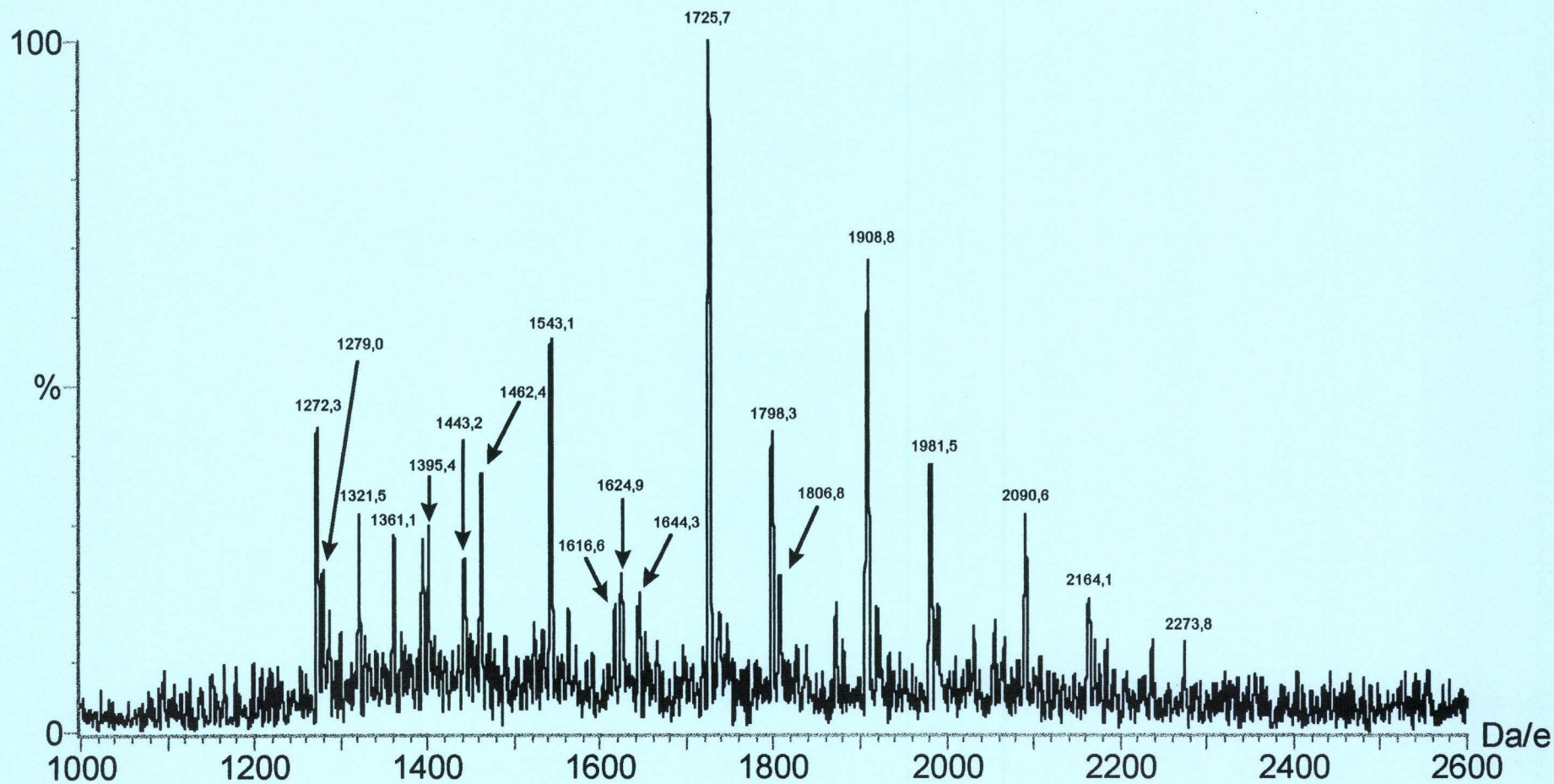
<sup>a</sup> d'après la nomenclature du tableau 6 page 102.

<sup>b</sup> la masse théorique du glycopeptide a été obtenue en ajoutant à la masse théorique du peptide (1112,2 Da) celle du glycanne et en retranchant la masse correspondant à l'élimination d'une molécule d'eau.



**Annexe 11 :** Histogramme présentant le pourcentage de chaque structure glycanne déduite pour le pic 5 du site Asn-24 de l'érythropoïétine humaine recombinante 97P16.





**Annexe 12 :** Spectre de masse correspondant aux N-glycopeptides désialylés du pic 5 du site de glycosylation Asn-24 de l'érythropoïétine humaine recombinante 97P22 obtenu par LC-MS.

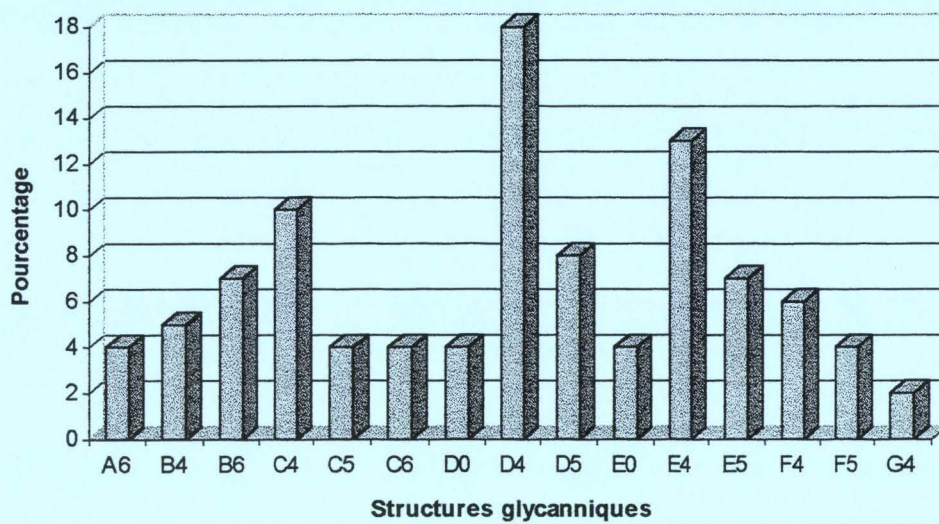
**Annexe 13 :** Structures glycaniques déduites d'après les ions de masse  $m/z$  observés sur le spectre de masse (Annexe 12) correspondant au pic 5 du site de glycosylation Asn-24 de l'érythropoïétine humaine recombinante 97P22.

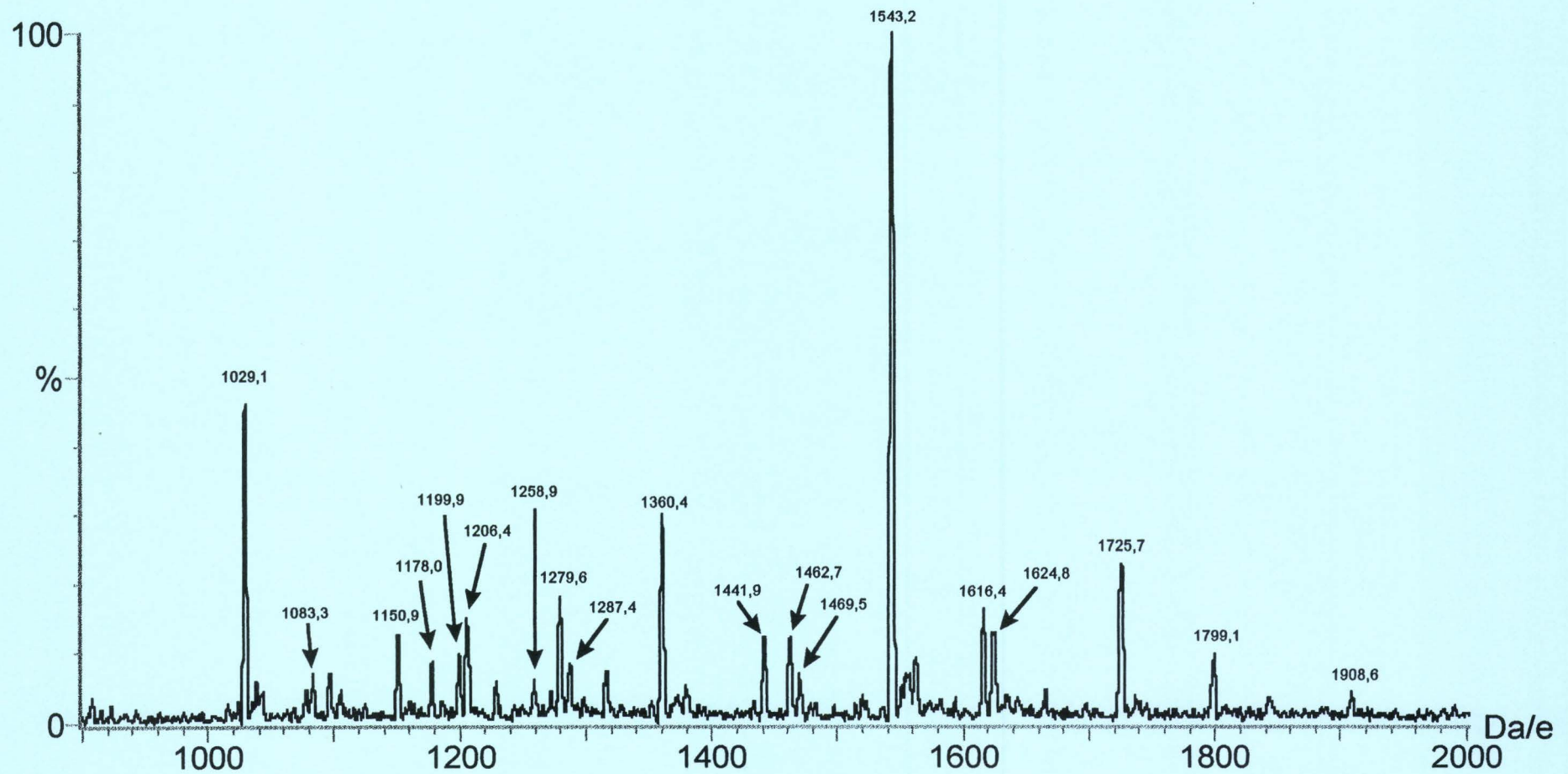
masse observée	état de charge	masse déconvoluée	structure glycanique déduite	masse théorique	pourcentage
1279,0	+2	2556,0	A6 <sup>a</sup>	2557,5 <sup>b</sup>	4
1361,1	+2	2720,2	B4	2719,7	5
1462,4	+2	2922,8	B6	2922,9	7
1543,1	+2	3084,2	C4	3085,0	10
1616,6	+2	3231,2	C5	3231,2	4
1644,3	+2	3286,4	C6	3288,2	4
1096,4	+3				
1624,9	+2	3247,8	D0	3247,2	4
1725,7	+2	3449,4	D4	3450,4	18
1150,8	+3				
1798,3	+2	3594,6	D5	3596,5	8
1806,8	+2	3611,6	E0	3612,5	4
1908,8	+2	3814,8	E4	3815,7	13
1272,3	+3				
1981,5	+2	3961,3	E5	3961,8	7
1321,5	+3				
2090,6	+2	4181,2	F4	4181,0	6
1395,4	+3				
2164,1	+2	4326,4	F5	4327,2	4
1443,2	+3				
2273,8	+2	4545,6	G4	4546,4	2

<sup>a</sup> d'après la nomenclature du tableau 6 page 102.

<sup>b</sup> la masse théorique du glycopeptide a été obtenue en ajoutant à la masse théorique du peptide (1112,2 Da) celle du glycanne et en retranchant la masse correspondant à l'élimination d'une molécule d'eau.

**Annexe 14 :** Histogramme présentant le pourcentage de chaque structure glycanique déduite pour le pic 5 du site Asn-24 de l'érythropoïétine humaine recombinante 97P22.





**Annexe 15 :** Spectre de masse correspondant aux N-glycopeptides désialylés du pic 6 du site de glycosylation Asn-24 de l'érythropoïétine humaine recombinante 97P16 obtenu par LC-MS.

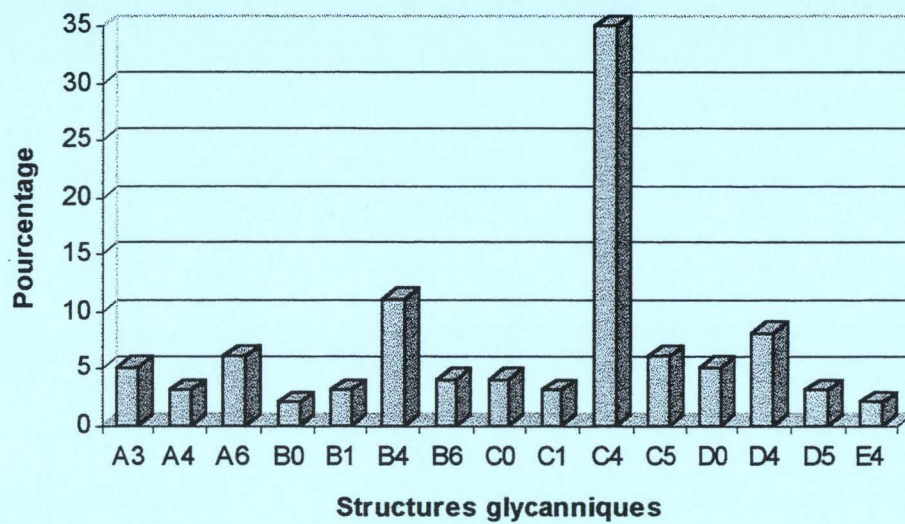
**Annexe 16 :** Structures glycaniques déduites d'après les ions de masse  $m/z$  observés sur le spectre de masse (Annexe 15) correspondant au pic 6 du site de glycosylation Asn-24 de l'érythropoïétine humaine recombinante 97P16.

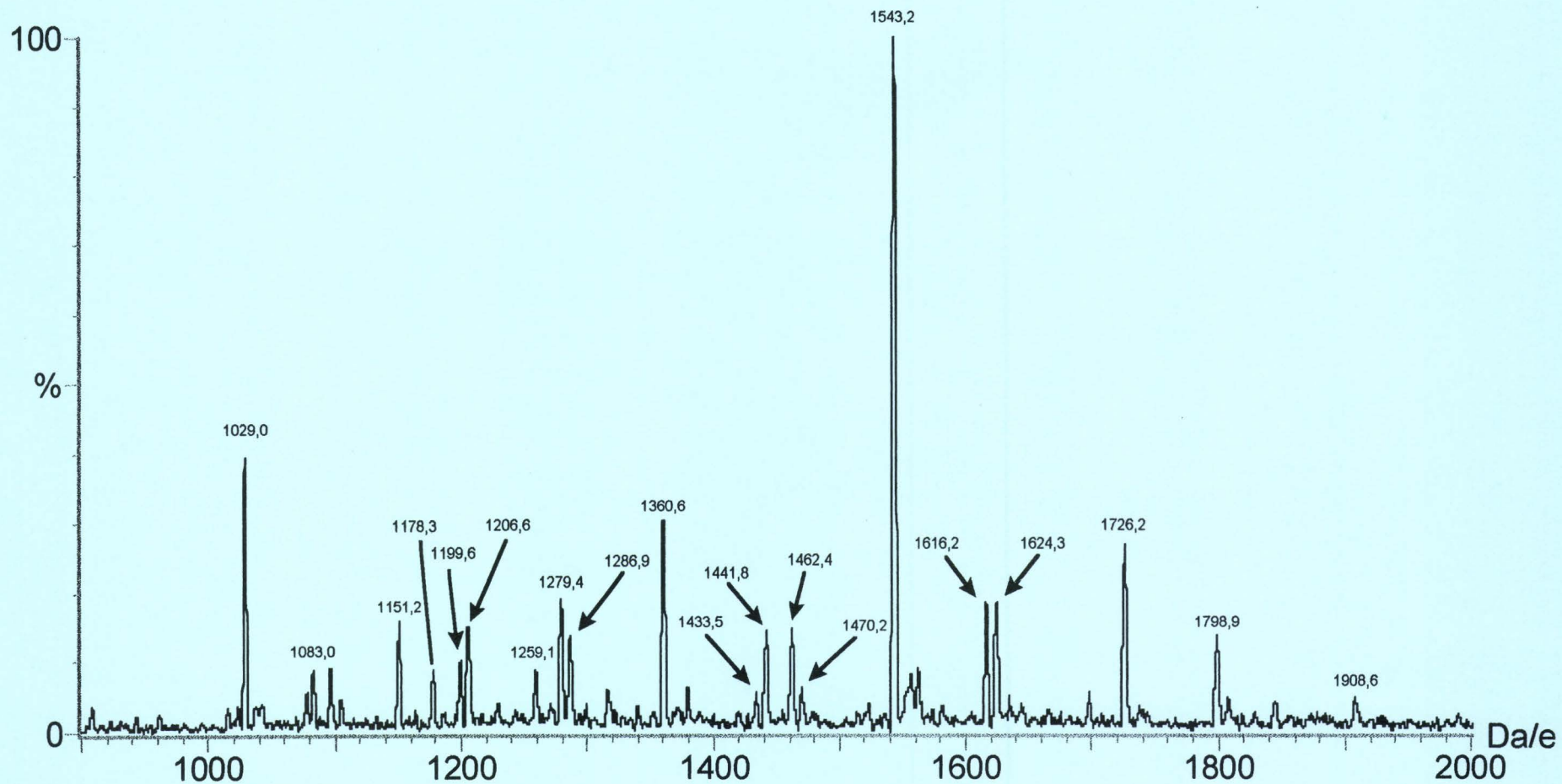
masse observée	état de charge	masse déconvoluée	structure glycanique déduite	masse théorique	pourcentage
1178,0	+2	2354,0	A4 <sup>a</sup>	2354,4 <sup>b</sup>	3
1206,4	+2	2410,8	A3	2411,4	5
1279,6	+2	2557,2	A6	2557,5	6
1258,9	+2	2515,8	B0	2516,5	2
1287,4	+2	2572,8	B1	2573,5	3
1360,4	+2	2718,8	B4	2719,7	11
1462,7	+2	2923,4	B6	2922,9	4
1441,9	+2	2881,8	C0	2881,8	4
1469,5	+2	2937,0	C1	2938,9	3
1543,2	+2	3084,4	C4	3085,0	35
1029,1	+3				
1616,4	+2	3230,8	C5	3231,2	6
1624,8	+2	3247,3	D0	3247,2	5
1083,3	+3				
1725,7	+2	3449,6	D4	3450,4	8
1150,9	+3				
1799,1	+2	3596,5	D5	3596,5	3
1199,9	+3				
1908,6	+2	3815,2	E4	3815,7	2

<sup>a</sup> d'après la nomenclature du tableau 6 page 102.

<sup>b</sup> la masse théorique du glycopeptide a été obtenue en ajoutant à la masse théorique du peptide (1112,2 Da) celle du glycanne et en retranchant la masse correspondant à l'élimination d'une molécule d'eau.

**Annexe 17 :** Histogramme présentant le pourcentage de chaque structure glycanique déduite pour le pic 6 du site Asn-24 de l'érythropoïétine humaine recombinante 97P16.





**Annexe 18 :** Spectre de masse correspondant aux N-glycopeptides désialylés du pic 6 du site de glycosylation Asn-24 de l'érythropoïétine humaine recombinante 97P22 obtenu par LC-MS.



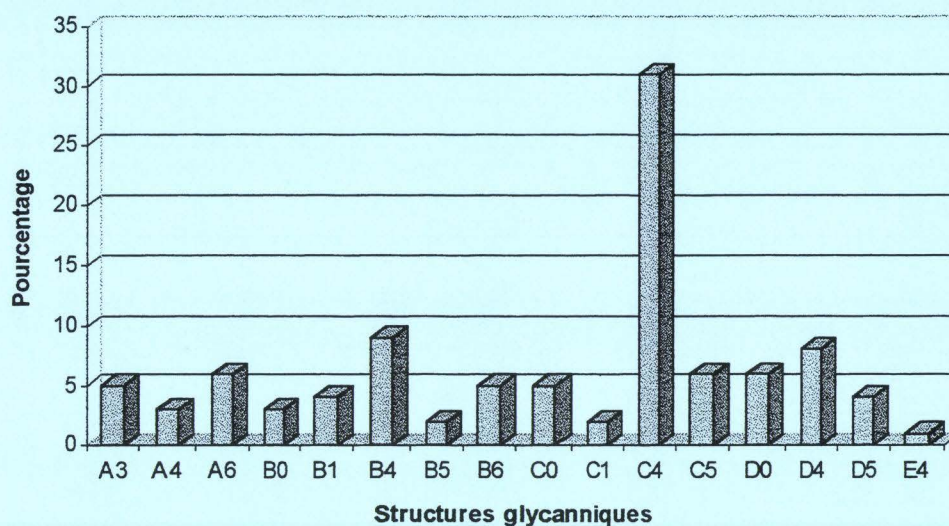
**Annexe 19 :** Structures glycaniques déduites d'après les ions de masse  $m/z$  observés sur le spectre de masse (Annexe 18) correspondant au pic 6 du site de glycosylation Asn-24 de l'érythropoïétine humaine recombinante 97P22.

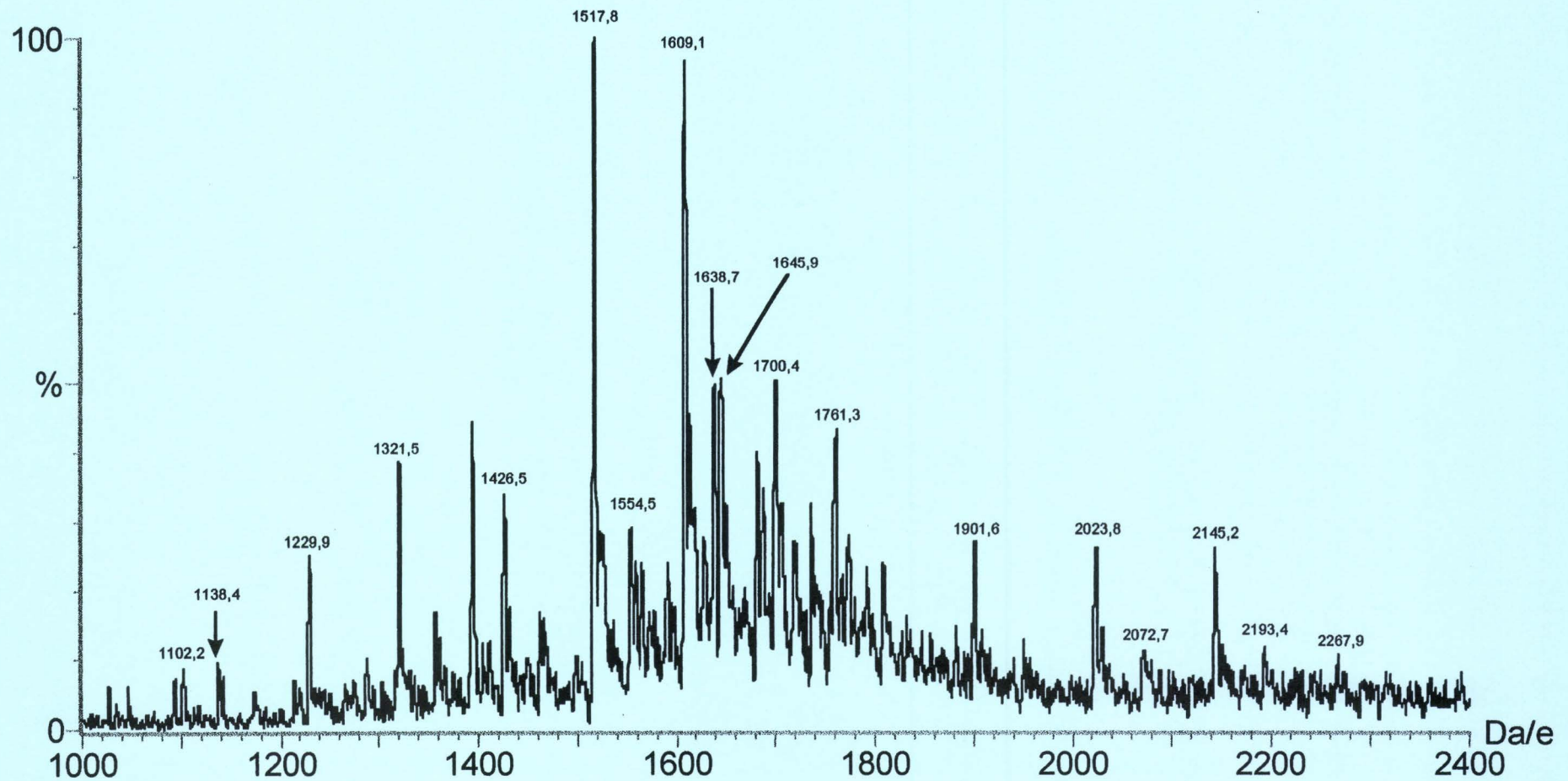
masse observée	état de charge	masse déconvoluée	structure glycanique déduite	masse théorique	pourcentage
1178,3	+2	2354,6	A4 <sup>a</sup>	2354,4 <sup>b</sup>	3
1206,6	+2	2411,2	A3	2411,4	5
1279,4	+2	2556,8	A6	2557,5	6
1259,1	+2	2516,2	B0	2516,5	3
1286,9	+2	2571,8	B1	2573,5	4
1360,6	+2	2720,4	B4	2719,7	9
908,2	+3				
1433,5	+2	2865,0	B5	2865,8	2
1462,4	+2	2922,8	B6	2922,9	5
1441,8	+2	2881,6	C0	2881,8	5
1470,2	+2	2938,4	C1	2938,9	2
1543,2	+2	3084,2	C4	3085,0	31
1029,0	+3				
1616,2	+2	3230,4	C5	3231,2	6
1624,3	+2	3246,3	D0	3247,2	6
1083,0	+3				
1726,2	+2	3450,5	D4	3450,4	8
1151,2	+3				
1798,9	+2	3595,8	D5	3596,5	4
1199,6	+3				
1908,6	+2	3815,2	E4	3815,7	1

<sup>a</sup> d'après la nomenclature du tableau 6 page 102.

<sup>b</sup> la masse théorique du glycopeptide a été obtenue en ajoutant à la masse théorique du peptide (1112,2 Da) celle du glycanne et en retranchant la masse correspondant à l'élimination d'une molécule d'eau.

**Annexe 20 :** Histogramme présentant le pourcentage de chaque structure glycanne déduite pour le pic 6 du site Asn-24 de l'érythropoïétine humaine recombinante 97P22.





**Annexe 21 :** Spectre de masse correspondant aux N-glycopeptides désialylés du pic 16 du site de glycosylation Asn-38 de l'érythropoïétine humaine recombinante 97P16 obtenu par LC-MS.

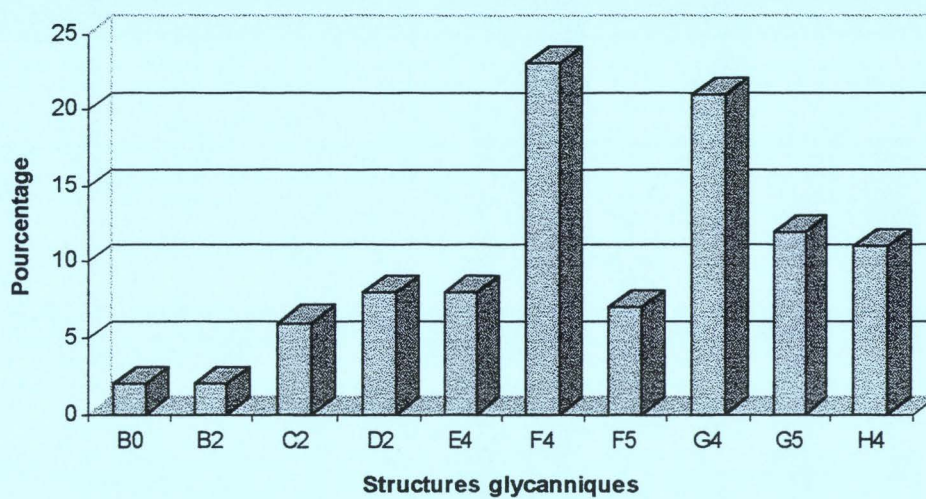
**Annexe 22 :** Structures glycanniques déduites d'après les ions de masse  $m/z$  observés sur le spectre de masse (Annexe 21) correspondant au pic 16 du site de glycosylation Asn-38 de l'érythropoïétine humaine recombinante 97P16.

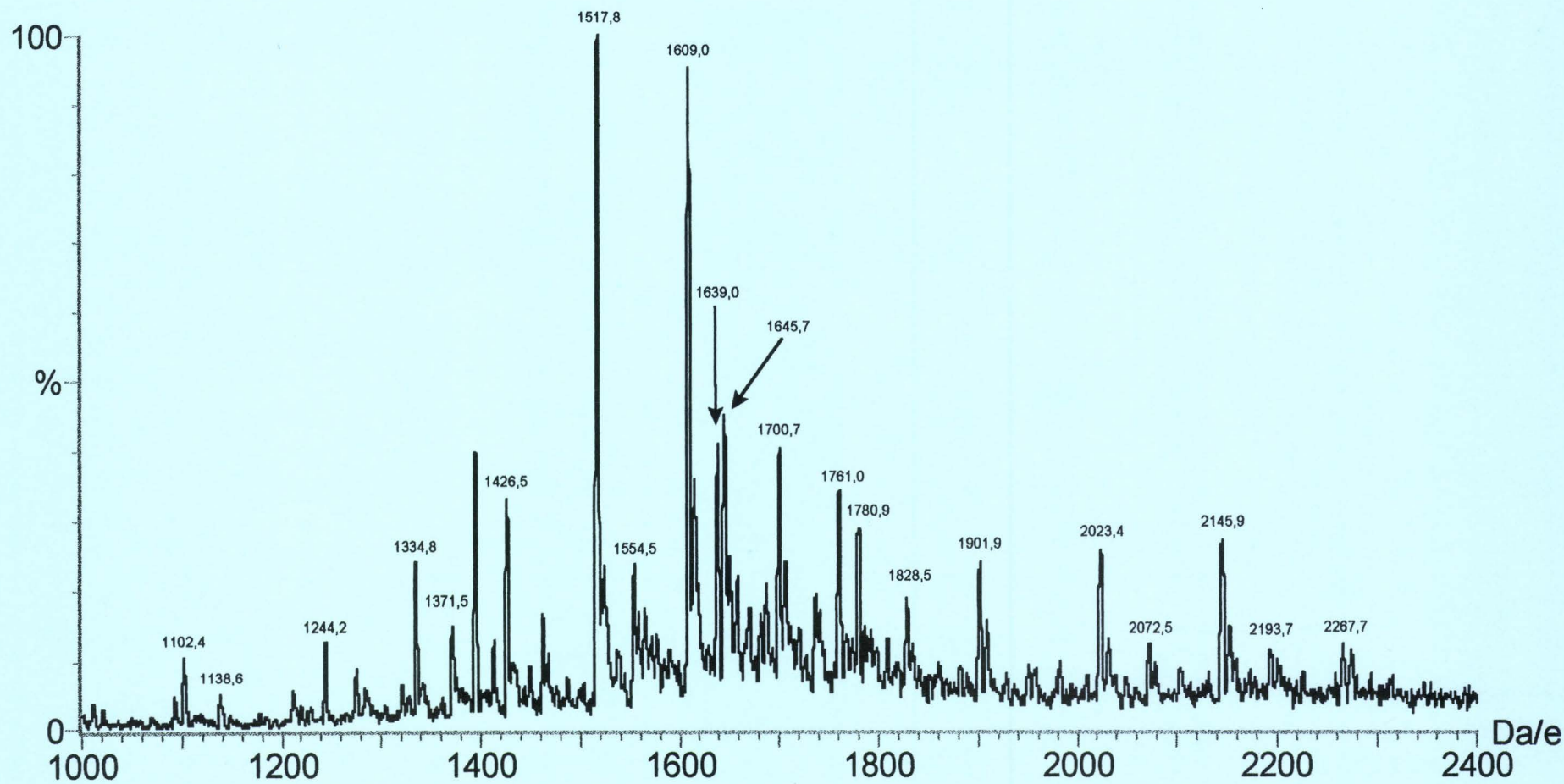
masse observée	état de charge	masse déconvoluée	structure glycannique déduite	masse théorique	pourcentage
1102,2	+4	4404,8	B0 <sup>a</sup>	4404,7 <sup>b</sup>	2
1138,4	+4	4549,6	B2	4550,9	2
1638,7	+3	4914,4	C2	4916,2	6
1229,9	+4				
1761,3	+3	5281,5	D2	5281,5	8
1321,5	+4				
1901,6	+3	5701,9	E4	5703,9	8
1426,5	+4				
2023,8	+3	6067,8	F4	6069,3	23
1517,8	+4				
2072,7	+3	6214,6	F5	6215,4	7
1554,5	+4				
2145,2	+3	6432,5	G4	6434,6	21
1609,1	+4				
2193,4	+3	6578,4	G5	6580,7	12
1645,9	+4				
2267,9	+3	6799,2	H4	6799,9	11
1700,4	+4				

<sup>a</sup> d'après la nomenclature du tableau 6 page 102.

<sup>b</sup> la masse théorique du glycopeptide a été obtenue en ajoutant à la masse théorique du peptide (3000,4 Da) celle du glycanne et en retranchant la masse correspondant à l'élimination d'une molécule d'eau.

**Annexe 23 :** Histogramme présentant le pourcentage de chaque structure glycanique déduite pour le pic 16 du site Asn-38 de l'érythropoïétine humaine recombinante 97P16.





**Annexe 24 :** Spectre de masse correspondant aux N-glycopeptides désialylés du pic 16 du site de glycosylation Asn-38 de l'érythropoïétine humaine recombinante 97P22 obtenu par LC-MS.

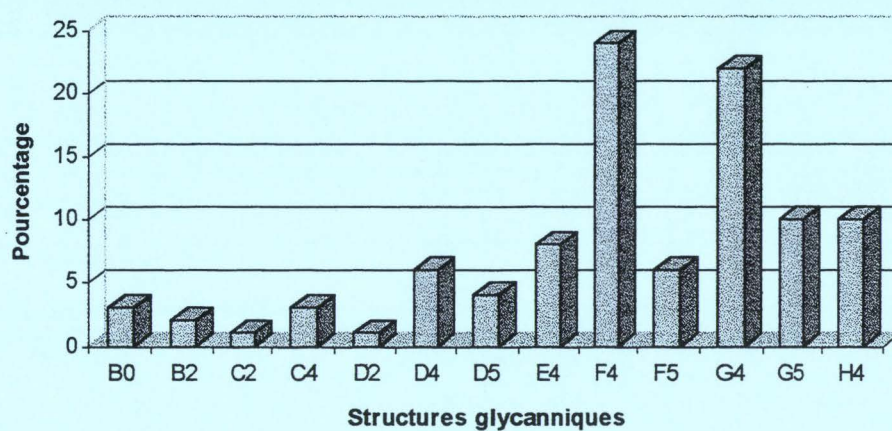
**Annexe 25 :** Structures glycaniques déduites d'après les ions de masse  $m/z$  observés sur le spectre de masse (Annexe 24) correspondant au pic 16 du site de glycosylation Asn-38 de l'érythropoïétine humaine recombinante 97P22.

masse observée	état de charge	masse déconvoluée	structure glycanique déduite	masse théorique	pourcentage
1102,4	+4	4405,6	B0 <sup>a</sup>	4404,7 <sup>b</sup>	3
1138,6	+4	4550,4	B2	4550,9	2
1639,0	+3	4914,8	C2	4916,2	1
1229,9	+4				
1244,2	+4	4972,8	C4	4973,2	3
1761,0	+3	5280,0	D2	5281,5	1
1780,9	+3	5337,5	D4	5338,6	6
1334,8	+4				
1828,5	+3				
1371,5	+4	5482,3	D5	5484,7	4
1901,9	+3	5702,4	E4	5703,9	8
1426,5	+4				
2023,4	+3	6067,2	F4	6069,3	24
1517,8	+4				
2072,5	+3	6214,3	F5	6215,4	6
1554,5	+4				
2145,9	+3	6433,4	G4	6434,6	22
1609,0	+4				
2193,7	+3	6578,5	G5	6580,7	10
1645,7	+4				
2267,7	+3	6799,5	H4	6799,9	10
1700,7	+4				

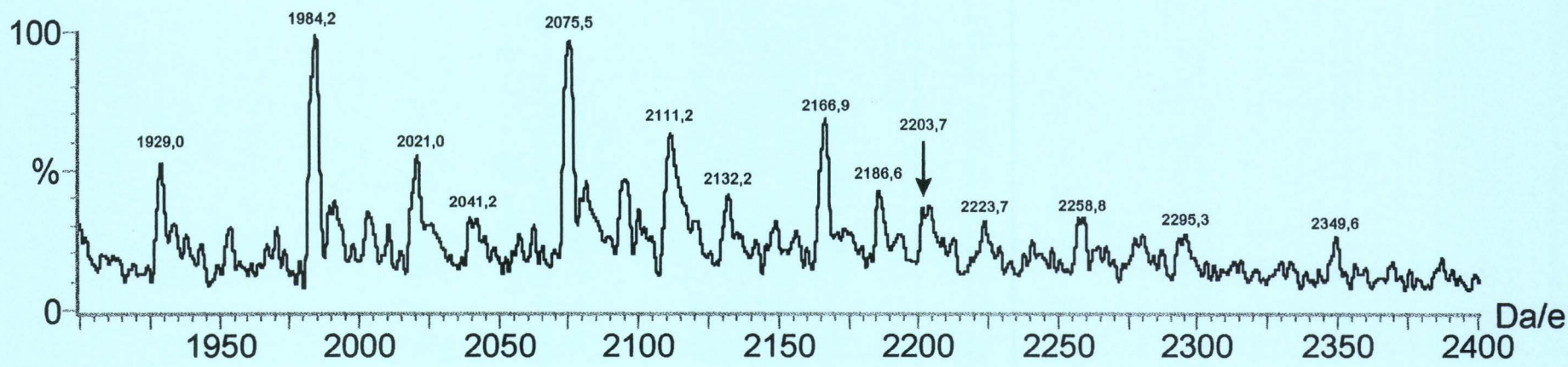
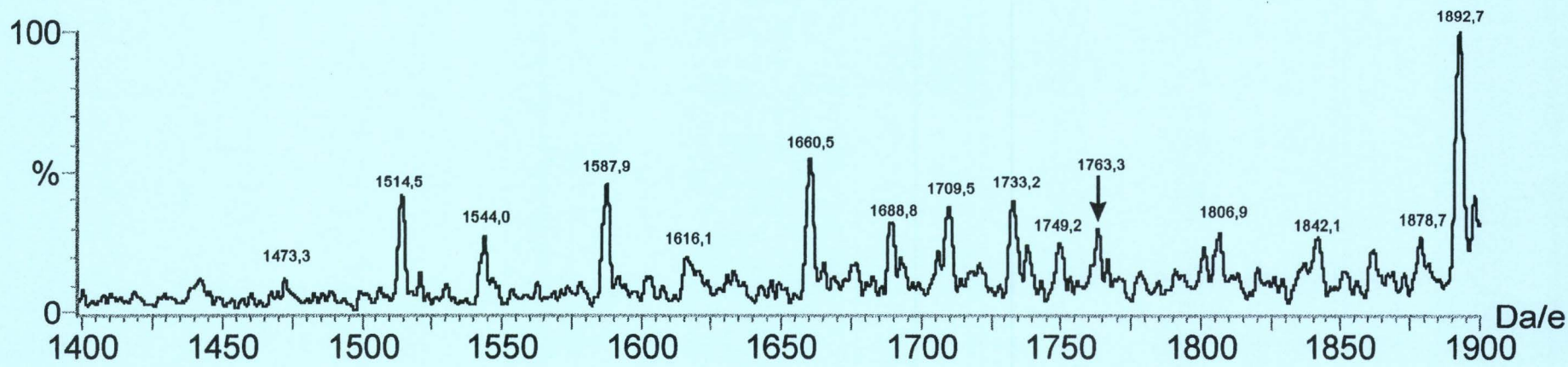
<sup>a</sup> d'après la nomenclature du tableau 6 page 102.

<sup>b</sup> la masse théorique du glycopeptide a été obtenue en ajoutant à la masse théorique du peptide (3000,4 Da) celle du glycanne et en retranchant la masse correspondant à l'élimination d'une molécule d'eau.

**Annexe 26 :** Histogramme présentant le pourcentage de chaque structure glycanique déduite pour le pic 16 du site Asn-38 de l'érythropoïétine humaine recombinante 97P22.







**Annexe 27 :** Spectre de masse correspondant aux N-glycopeptides désialylés du site de glycosylation Asn-83 de l'érythropoïétine humaine recombinante 97P16 obtenu par LC-MS.

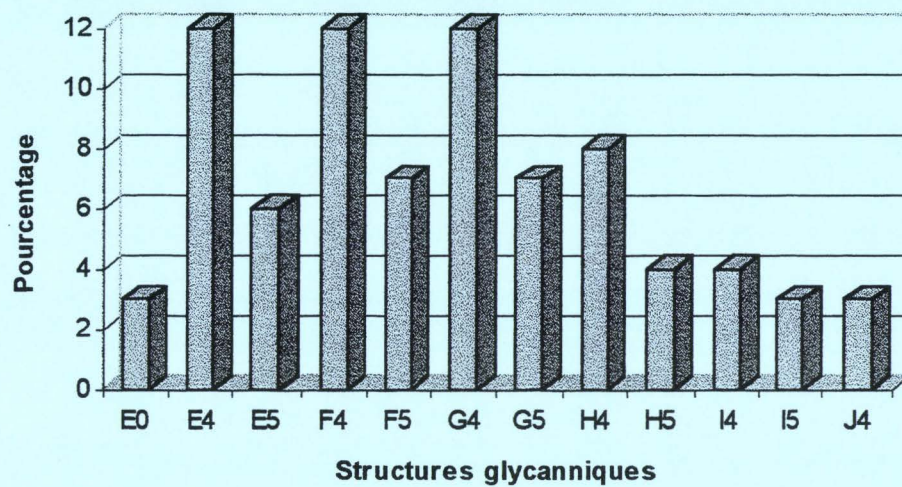
**Annexe 28 :** Structures glycaniques « non substituées » déduites d'après les ions de masse  $m/z$  observés sur le spectre de masse (Annexe 27) correspondant au site de glycosylation Asn-83 de l'érythropoïétine humaine recombinante 97P16.

masse observée	état de charge	masse déconvoluée	structure glycanique déduite	masse théorique	pourcentage
1842,1	+4	7364,4	E0 <sup>a</sup>	7365,9 <sup>b</sup>	3
1473,3	+5				
1892,7	+4	7567,2	E4	7569,1	12
1514,5	+5				
1929,0	+4	7713,5	E5	7715,3	6
1544,0	+5				
1984,2	+4	7933,7	F4	7934,4	12
1587,9	+5				
2021,0	+4	8080,0	F5	8080,6	7
1616,1	+5				
2075,5	+4	8297,8	G4	8299,8	12
1660,5	+5				
2111,2	+4	8440,8	G5	8445,9	7
1688,8	+5				
2166,9	+4	8663,6	H4	8665,1	8
1733,2	+5				
2203,7	+4	8811,2	H5	8811,3	4
1763,3	+5				
2258,8	+4	9030,4	I4	9030,5	4
1806,9	+5				
2295,3	+4	9177,2	I5	9176,6	3
2349,6	+4				
1878,7	+5	9394,4	J4	9395,8	3

<sup>a</sup> d'après la nomenclature du tableau 6 page 102.

<sup>b</sup> la masse théorique du glycopeptide a été obtenue en ajoutant à la masse théorique du peptide (4865,6 Da) celle du glycanne et en retranchant la masse correspondant à l'élimination d'une molécule d'eau.

**Annexe 29 :** Histogramme présentant le pourcentage de chaque structure glycanique « non substituée » déduite pour le site Asn-83 de l'érythropoïétine humaine recombinante 97P16.



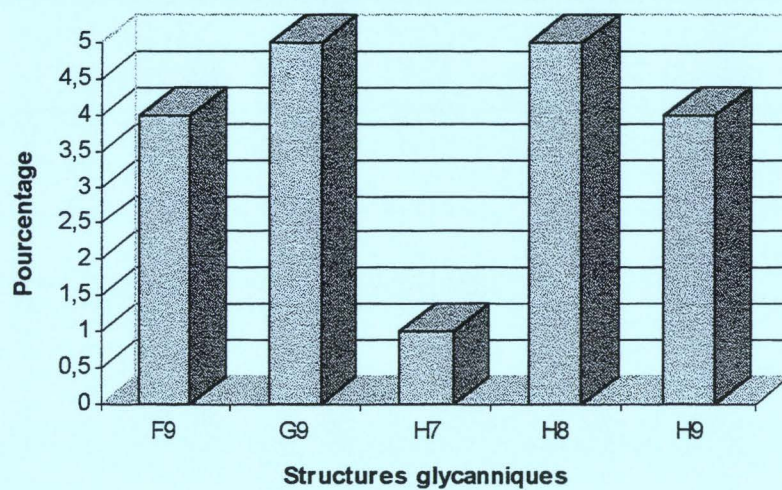
**Annexe 30 :** Structures glycaniques « substituées » déduites d'après les ions de masse  $m/z$  observés sur le spectre de masse (Annexe 27) correspondant au site de glycosylation Asn-83 de l'érythropoïétine humaine recombinante 97P16.

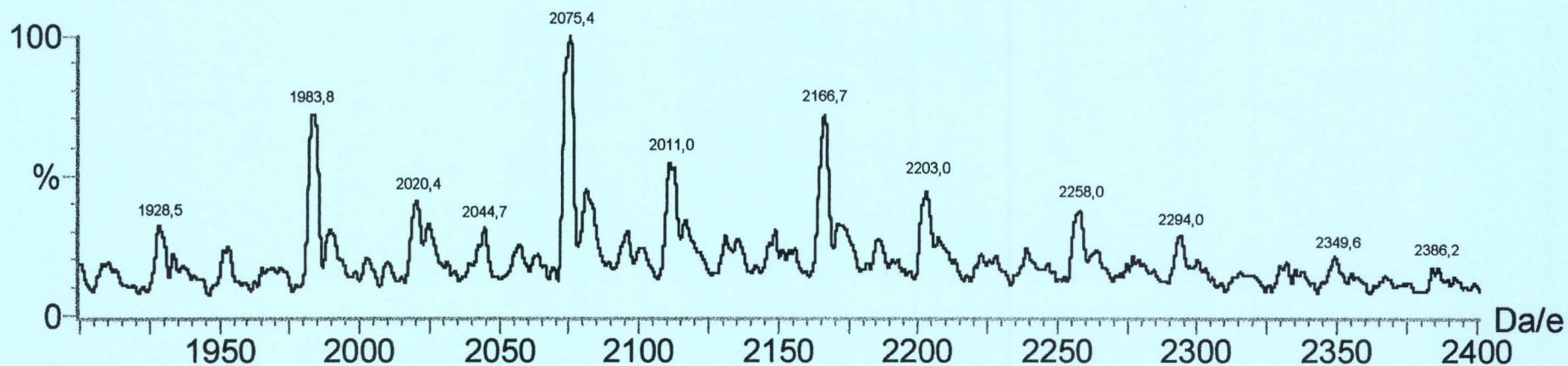
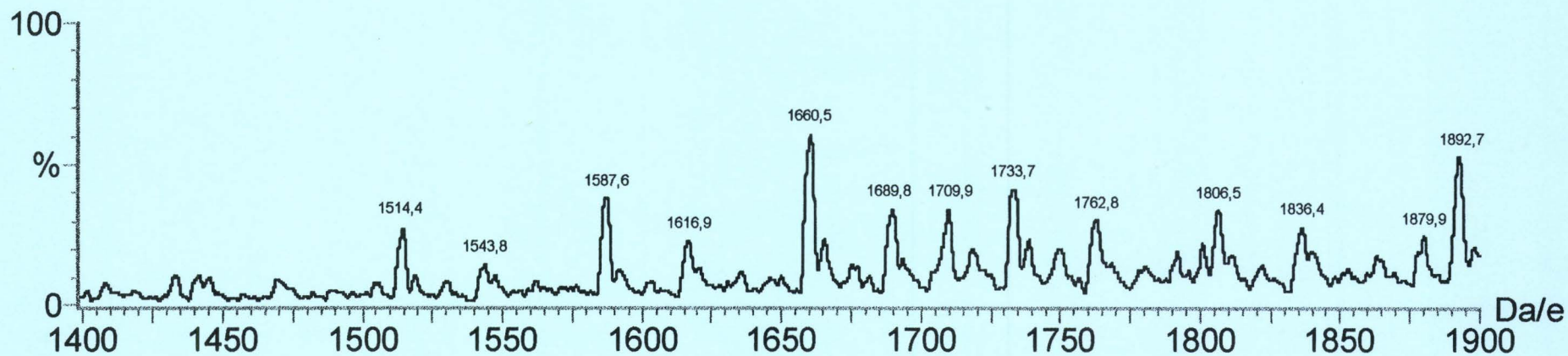
masse observée	état de charge	masse déconvoluée	structure glycanique déduite	masse théorique	pourcentage
2041,2	+4	8160,8	F9 <sup>a</sup>	8160,7 <sup>b</sup>	4
2132,2	+4	8524,8	G9	8526,0	5
1709,5	+5	8542,5	H7	8542,0	1
2186,6	+4	8741,7	H8	8745,2	5
1749,2	+5				
2223,7	+4	8890,8	H9	8891,3	4

<sup>a</sup> d'après la nomenclature du tableau 6 page 102.

<sup>b</sup> la masse théorique du glycopeptide a été obtenue en ajoutant à la masse théorique du peptide (4865,6 Da) celle du glycanne et en retranchant la masse correspondant à l'élimination d'une molécule d'eau.

**Annexe 31 :** Histogramme présentant le pourcentage de chaque structure glycanique substituée par un groupement sulfate ou phosphate déduite pour le site Asn-83 de l'érythropoïétine humaine recombinante 97P16.





**Annexe 32 :** Spectre de masse correspondant aux N-glycopeptides désialylés du site de glycosylation Asn-83 de l'érythropoïétine humaine recombinante 97P22 obtenu par LC-MS.

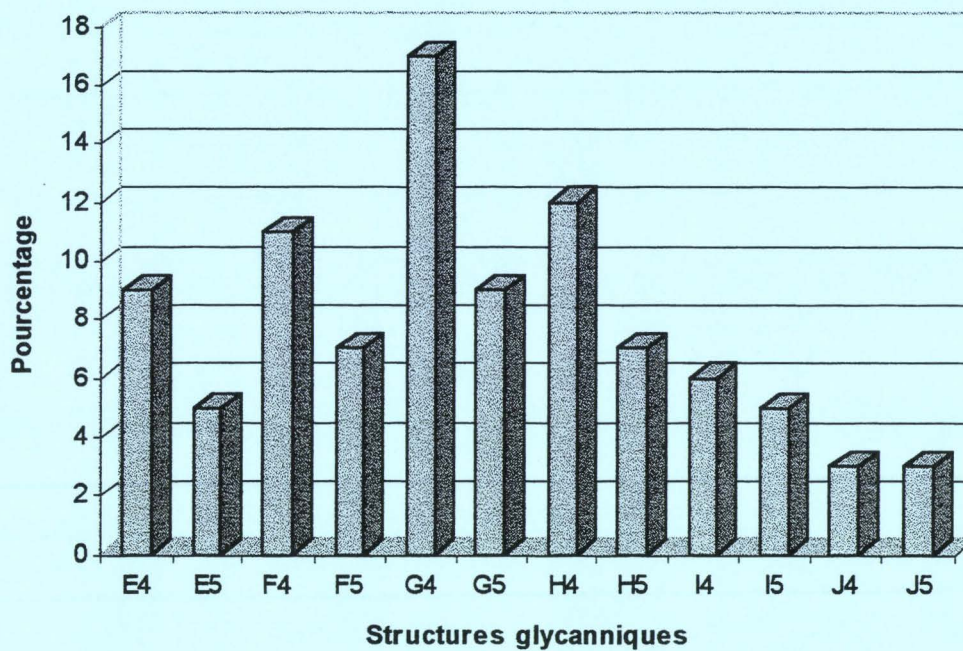
**Annexe 33 :** Structures glycaniques « non substituées » déduites d'après les ions de masse  $m/z$  observés sur le spectre de masse (Annexe 32) correspondant au site de glycosylation Asn-83 de l'érythropoïétine humaine recombinante 97P22.

masse observée	état de charge	masse déconvoluée	structure glycanique déduite	masse théorique	pourcentage
1892,7	+4	7566,9	E4 <sup>a</sup>	7569,1 <sup>b</sup>	9
1514,4	+5				
1928,5	+4	7712,0	E5	7715,3	5
1543,8	+5				
1983,8	+4	7932,1	F4	7934,4	11
1587,6	+5				
2020,4	+4	8078,6	F5	8080,6	7
1616,9	+5				
2075,4	+4	8297,6	G4	8299,8	17
1660,5	+5				
2111,0	+4	8442,0	G5	8445,9	9
1689,8	+5				
2166,7	+4	8663,2	H4	8665,1	12
1733,7	+5				
2203,0	+4	8808,5	H5	8811,3	7
1762,8	+5				
2258,0	+4	9027,8	I4	9030,5	6
1806,5	+5				
2294,0	+4	9174,5	I5	9176,6	5
1836,4	+5				
2349,6	+4	9394,5	J4	9395,8	3
1879,9	+5				
2386,2	+4	9540,8	J5	9541,9	3

<sup>a</sup> d'après la nomenclature du tableau 6 page 102.

<sup>b</sup> la masse théorique du glycopeptide a été obtenue en ajoutant à la masse théorique du peptide (4865,6 Da) celle du glycanne et en retranchant la masse correspondant à l'élimination d'une molécule d'eau.

**Annexe 34 :** Histogramme présentant le pourcentage de chaque structure glycanique « non substituée » déduite pour le site Asn-83 de l'érythropoïétine humaine recombinante 97P22.





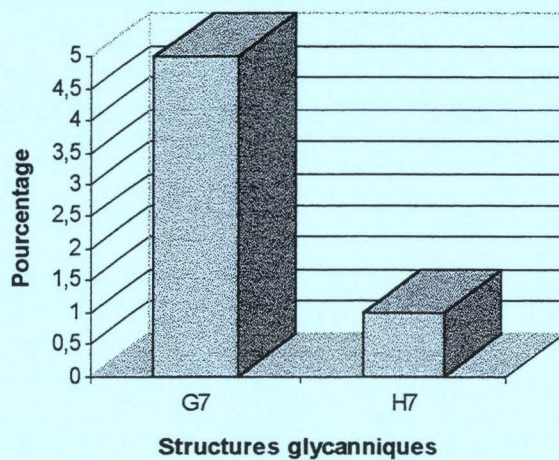
**Annexe 35 :** Structures glycaniques « substituées » déduites d'après les ions de masse  $m/z$  observés sur le spectre de masse (Annexe 32) correspondant au site de glycosylation Asn-83 de l'érythropoïétine humaine recombinante 97P22.

masse observée	état de charge	masse déconvoluée	structure glycanique déduite	masse théorique	pourcentage
2044,7	+4	8174,8	G7 <sup>a</sup>	8176,6 <sup>b</sup>	5
1709,9	+5	8544,5	H7	8542,0	1

<sup>a</sup> d'après la nomenclature du tableau 6 page 102.

<sup>b</sup> la masse théorique du glycopeptide a été obtenue en ajoutant à la masse théorique du peptide (4865,6 Da) celle du glycanne et en retranchant la masse correspondant à l'élimination d'une molécule d'eau.

**Annexe 36 :** Histogramme présentant le pourcentage de chaque structure glycanique substituée par un groupement sulfate ou phosphate déduite pour le site Asn-83 de l'érythropoïétine humaine recombinante 97P22.



# **BIBLIOGRAPHIE**

**A**

Abeijon, C., Hirschberg, C.B., (1992) Topography of glycosylation reactions in the ER. *Trends in Biochem. Sci.*, **17**, 32-36.

Ashwell, G. and Harford, J., (1992) Carbohydrate-specific receptors of the liver. *Annu. Rev. Biochem.*, **51**, 531-554.

**B**

Barthomeuf, C., Serre, A.-F. et Souweine, B. (1996a) L'érythropoïétine recombinante. *Biofutur*, **155**, 15-23.

Barthomeuf, C., Deteix, P., Serre, A.-F. et Souweine, B. (1996b) Indications thérapeutiques de l'érythropoïétine recombinante. *Biofutur*, **155**, 23-28.

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

Bergrem, H., Danielson, B.G., Eckardt, K.U., Kurtz, A., Stridsberg, M. (1993) A case of antierythropoietin antibodies following recombinant human erythropoietin treatment. In : Bauer, C., Koch, K.M., Scigalla, P., Wiczorek, L., eds. *Erythropoietin : molecular physiology and clinical applications*. New York : Marcel Dekker, 265-73.

Beru, N., McDonald, J., Lacombe, C. and Goldwasser, E. (1986) Expression of the erythropoietin gene. *Mol. Cell. Biol.*, **6**, 2571-2575.

Bleil, J.D. and Wassarman, P.M. (1988) Galactose at the non-reducing terminus of O-linked oligosaccharides of mouse egg zona pellucida glycoprotein ZP3 is essential for the glycoprotein's sperm receptor activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 6778-6782.

Boffa, G. A. (1991) L'érythropoïétine humaine et ses cibles cellulaires. *Rev. Fr. Transfus. Hémodiol.*, **34**, 49-62.

Boissel, J.-P., Lee, W.-R., Presnell, S.R., Cohen, F.E. and Bunn H.F. (1993) Erythropoietin structure-function relationships. Mutant proteins that test a model of tertiary structure. *J. Biol. Chem.*, **268**, 15983-15993.

Brinkman-Van Der Linden, E.C.M., Van Ommen, E.C.R. and Van Dijk, W. (1996) Glycosylation of  $\alpha$ 1-acid glycoprotein in septic shock : changes in degree of branching and in expression of sialyl Lewis<sup>x</sup> groups. *Glycoconjugate Journal*, **13**, 27-31.

Brockhausen, I, Narasimhan, S. and Schachter, H. (1988) The biosynthesis of highly branched N-glycans : studies on the sequential pathway and functional role of N-acetylglucosaminyltransferases I, II, III, IV, V and VI. *Biochimie*, **70**, 1521-1533.

Brokhausen, H. (1995) Biosynthesis of O-glycans of the N-acetylgalactosamine- $\alpha$ -Ser/Thr linkage type. In *Glycoproteins* (edited by Montreuil J., Vliegenthart J.F.G. and Schachter H./Elsevier Science B.V.) *New Comprehensive Biochemistry*, **290**, 201-259.

## C

- Camphausen, R.T., Yu, H.-A. and Cumming, D.A. (1995) The role of polypeptide in the biosynthesis of protein-linked oligosaccharides. In *Glycoproteins* (edited by Montreuil J., Vliegthart J.F.G. and Schachter H./Elsevier Science B.V.) *New Comprehensive Biochemistry*, 391-414.
- Carver, (1987) Site-directed processing of N-linked oligosaccharides : the role of three-dimensional structure. *Pure Appl. Chem.*, **59**, 1465-1476.
- Casadevall, N. (1995) Erythropoïétine et prélèvement autologue différé : de la sécrétion physiologique au rationnel de la supplémentation exogène. *Nouv. Rev. Fr. Hematol.*, **37**, S11-S15.
- Casadevall, N., Dupuy, E., Molho-Sabatier, P., Tobelem, G., Varet, B. and Mayeux, P. (1996) Autoantibodies against erythropoietin in a patient with pure red-cell aplasia. *N. Engl. J. Med.*, **334**, 630-633.
- Chawla, D. and Hughes, R.C. (1991) Effects of Brefeldin A on oligosaccharide processing. Evidence for decreased branching of complex-type glycans and increased formation of hybrid-type glycans. *Biochem. J.*, **279**, 159-165.
- Choi, D., Kim, M., Park, J. (1996) Erythropoietin : physico- and biochemical analysis. *Journal of Chromatography B*, **687**, 189-199.
- Clausen, H. and Bennett, E.P. (1996) A family of UDP-GalNAc : polypeptide N-acetylgalactosaminyl-transferases control the initiation of mucin-type O-linked glycosylation. *Glycobiology*, **6**, 635-646.
- Coddeville, B., Strecker, G., Wieruszkeski, J.M., Spik, G., Vliegthart, J.F.G., van Halbeek, H., Peter-Katalinic, J. and Egge, H. (1992) Heterogeneity of bovine lactotransferrin glycans. Characterization of  $\alpha$ -Gal-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -Gal and  $\alpha$ -NeuAc-(2 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -GalNAc-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -GlcNAc substituted N-glycans. *Carbohydr. Res.*, **236**, 145-164.
- Crocker, P.R. and Feizi, T. (1996) Carbohydrate recognition systems : functional triads in cell-cell interactions. *Current Opinion in Structural Biology*, **6**, 679-691.
- Cumming, D.A. (1991) Glycosylation of recombinant protein therapeutics : control and functional implications. *Glycobiology*, **1**, 115-130.

## D

- Dahms, N.M., Lobel, P. and Kornfeld, S. (1989) Mannose 6-phosphate receptors and lysosomal enzyme targeting. *J. Biol. Chem.*, **264**, 12115-12118.
- Damen, J.E., Krystal, G. (1996) Early events in erythropoietin-induced signaling. *Experimental Hematology*, **24**, 1455-1459.

Davis, J.M., Arakawa, T., Strickland, T.W., Yphantis, D.A. (1987) Characterization of recombinant human erythropoietin produced in Chinese Hamster Ovary cells. *Biochemistry*, **26**, 2633-2638.

Delorme, E., Lorenzini, T., Giffin, J., Martin, F., Jacobsen, F., Boone, T. and Elliott, S. (1992) Role of glycosylation on the secretion and biological activity of erythropoietin. *Biochemistry*, **31**, 9871-9876.

Digicaylioglu, M., Bichet, S., Marti, H.H., Wenger, R.H., Rivas, L.A., Bauer, C. and Gassmann, M. (1995) Localization of specific erythropoietin binding sites in defined areas of the mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 3717-3720.

Dordal, M. S., Wang, F. F. and Goldwasser, E. (1985) The role of carbohydrate in erythropoietin action. *Endocrinology*, **116**, 2293-2299.

Dubé, S., Fisher, J. W. and Powell, J. S. (1988) Glycosylation at specific sites of erythropoietin is essential for biosynthesis, secretion, and biological function. *J. Biol. Chem.*, **263**, 17516-17521.

Dusanter-Fourt, I., Casadevall, N., Lacombe, C., Muller, O., Billat, C., Fischer, S. and Mayeux, P. (1992) Erythropoietin induces the tyrosine phosphorylation of its own receptor in human erythropoietin-responsive cells. *J. Biol. Chem.*, **267**, 10670-10675.

## **E**

Elices, M.J. and Goldstein, I.J. (1990) Initiation of poly-N-acetyllactosamine chain biosynthesis occurs preferentially on complex multiantennary asparagine-linked oligosaccharides. *Carbohydrate Research*, **203**, 109-118.

Elliott, S., Bartley, T., Delorme, D., Derby, P., Hunt, R., Lorenzini, T., Parker, V., Rohde, M.F. and Stoney, K. (1994) Structural requirements for addition of O-linked carbohydrate to recombinant erythropoietin. *Biochemistry*, **33**, 11237-11245.

Elliott, S., Chang, D., Delorme, E., Dunn, C., Egrie, J., Giffin, J., Lorenzini, T., Talbot, C. and Hesterberg, L. (1996) Isolation and characterization of conformation sensitive antierythropoietin monoclonal antibodies : effect of disulfide bonds and carbohydrate on recombinant human erythropoietin structure. *Blood*, **87**, 2714-2722.

Elliott, S., Lorenzini, T., Chang, D., Barzilay, J. and Delorme, E. (1997) Mapping of the active site of recombinant human erythropoietin. *Blood*, **89**, 493-502.

Erslev, A.J. (1990) Erythropoietin. *Leukemia Research*, **148**, 683-688.

Erslev, A.J. and Besarab, A. (1997) Erythropoietin in the pathogenesis and treatment of the anemia of chronic renal failure. *Kidney international*, **51**, 622-630.

## **F**

Fandrey, J. (1995) Hypoxia-inducible gene expression. *Respiration physiology*, **101**, 1-10.

Feizi, T. (1982) Antigenicities of mucins-their relevance to tumour associated and stage specific embryonic antigens. *Mucus in Health and Disease*, Vol. II (E.N. Chandler, J.B. Elder and M. Elstein, ed.). Plenum Press, New York, 29-37.

Fisher, J.W. and Birdwell, B.J. (1961) The production of an erythropoietic factor by the in situ perfused kidney. *Acta Haematol.*, **26**, 224-232.

Foa, P. (1991) Erythropoietin : clinical applications. *Acta haematol.*, **86**, 162-168.

Fried, W. (1972) The liver as a source of extrarenal erythropoietin production. *Blood*, **40**, 671-677.

Fukuda, M. N., Sasaki, H., Lopez, L. and Fukuda, M. (1989) Survival of recombinant erythropoietin in the circulation : the role of carbohydrates. *Blood*, **73**, 84-89.

## G

Garcia, J.E., Senent, C., Pascual, C. (1993) Anaphylactic reaction to recombinant human erythropoietin. *Nephron*, **65**, 636-637.

Gareau, R., Audran, M., Baynes, R.D., Flowers, C.H., Duvallet, A., Senécal, L., Brisson, G.R. (1996) Erythropoietin abuse in athletes. *Nature*, **380**, 113.

Gobert, S., Duprez, V., Lacombe, C., Gisselbrecht, S. and Mayeux P. (1995) The signal transduction pathway of erythropoietin involves three forms of mitogen-activated protein (MAP) kinases in UT7 erythroleukemia cells. *Eur. J. Biochem.*, **234**, 75-83.

Goldberg, M. A., Dunning, S.P., Bunn, H.F. (1988) Regulation of the erythropoietin gene : evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Science*, **242**, 1413-1415.

Goldwasser, E (1984) Erythropoietin and its mode of action. *Blood cells*, **10**, 147-162.

Goodnough, L.T., Monk T.G. and Andriole, G.L. (1997) Erythropoietin therapy. *The New England Journal of Medicine*, **336**, 933-938.

Göpfert, T., Gess, B., Eckardt, K.U. and Kurtz, A. (1996) Hypoxia signalling in the control of erythropoietin gene expression in rat hepatocytes. *Journal of cellular physiology*, **168**, 354-361.

Grabenhorst, E., Hofer, B., Nimitz, M., Jäger, V. and Conradt, M. S. (1993) Biosynthesis and secretion of human interleukin-2 glycoprotein variants from baculovirus-infected sf-1 cells. *Eur. J. Biochem.*, **215**, 189-197.

Green, M. (1982) Incorporation of amino acid analogs interferes with the processing of the asparagine-linked oligosaccharide of the MOPC-46 B  $\kappa$  light chain. *J. Biol. Chem.*, **257**, 9039-9042.

Gribben, J.G., Devereux, S., Thomas, N.S.B., Keim, M., Jones, H.M., Goldstone, A.H. and Linch, D.C. (1990) Development of antibodies to unprotected glycosylation sites on recombinant human GM-CSF. *Lancet*, **335**, 434-437.

Gross, V., Steube, K., Tran-Hi, T.-A., Haussinger, D., Legler, G., Decker, K., Heinrich, P.C. and Gerok, W. (1987) The role of N-glycosylation for the plasma clearance of rat liver secretory glycoproteins. *Eur. J. Biochem.*, **162**, 83-88.

## H

Hagopian, A. and Eylar, E.H. (1968) Glycoprotein biosynthesis : Studies on the specificity of the polypeptidyl : N-aceyl-galactosaminyl transferase from bovine submaxillary glands. *Arch. Biochem. Biophys.*, **128**, 422-433.

Hannover, J.A. and Lennarz, W.J. (1982) Transmembrane assembly of N-linked glycoproteins. Studies on the topology of saccharide-lipid synthesis. *J. Biol. Chem.*, **257**, 2787-2794.

Hara, S., Takemori, Y., Yamaguchi, M., Nakamura, M. and Ohkura, Y. (1987) Fluorometric High-Performance Liquid Chromatography of N-acetyl- and N-glycolylneuraminic acids and its application to their microdetermination in human and animal sera, glycoproteins and glycolipids. *Anal. Biochem.*, **164**, 138-145.

Hart, G.W., Brew, K., Grant, G.A. and Lennarz, W.J. (1979) Primary structural requirement for enzymatic formation of the N-glycosyl bond in glycoproteins. *J. Biol. Chem.*, **254**, 9747-9753.

Hettkamp, H., Legler, G. and Bause, E. (1984) Purification by affinity chromatography of glucosidase I and endoplasmic reticulum hydrolase involved in the processing of asparagine-linked oligosaccharides. *Eur. J. Biochem.*, **142**, 85-90.

Higuchi, M., Oh-eda, M., Kuboniwa H., Tomonoh, K., Shimonaka, Y. and Ochi, N. (1992) Role of sugar chains in the expression of the biological activity of human erythropoietin. *J. Biol. Chem.*, **267**, 7703-7709.

Hokke, C.H., Bergwerff, A.A., Van Dedem, G.W.K., Kamerling, J.P. and Vliegthart, J.F.G. (1995) Structural analysis of the sialylated N- and O-linked carbohydrate chains of recombinant human erythropoietin expressed in Chinese Hamster Ovary cells. Sialylation patterns and branch of N-acetylactosamine units. *Eur. J. Biochem.*, **228**, 981-1008.

Hokke, C.H., Bergwerff, A.A., Van Dedem, G.W.K., Van Oostrum, J., Kamerling, J.P. and Vliegthart, J.F.G. (1990) Sialylated carbohydrate chains of recombinant human glycoproteins expressed in chinese hamster ovary cells contain traces of N-glycolylneuraminic acid. *FEBS Letters*, **275**, 9-14.

Hounsell, E.F. and Feizi, T. (1982) Gastrointestinal mucins. Structures and antigenicities of their carbohydrate chains in health and disease. *Med. Biol.*, **60**, 227-236.

Hounsell, E.F., Lawson, A.M. and Feizi, T. (1982) Structural and antigenic diversity in mucin carbohydrate chains. In *Mucus in Health and Disease*, Vol. II, (E.N. Chandler; J.B. Elder and M. Elstein ed.). Plenum Press; New York, 39-41.



## J

Imai, N., Higuchi, M., Kawamura, A., Tomonoh, K., OH-eda, M., Fujiwara, M., Shimonaka, Y. and Ochi, N. (1990b) Physicochemical and biological Characterization of asialoerythropoietin. Suppressive effects of sialic acid in the expression of biological activity of human erythropoietin *in vitro*. *Eur. J. Biochem.*, **194**, 457-462.

Imai, N., Kawamura, A., Higuchi, M., Oh-eda, M., Orita, T., Kawaguchi, T. and Ochi, N. (1990a) Physicochemical and biological comparison of recombinant human erythropoietin with human urinary erythropoietin. *J. Biochem.*, **107**, 352-359.

Inoue, N., Takeuchi, M., Ohashi, H., Suzuki, T. (1995) The production of recombinant human erythropoietin. *Biotechnology Annual Review*, **1**, 297-313.

Ishibashi, K., Nishikawa, A., Hayashi, N., Kasahara, A., Sato, N., Fujii, S., Kamada, T. and Taniguchi, N. (1989) N-acetylglucosaminyltransferase III in human serum and liver and hepatoma tissues : increased activity in liver cirrhosis and hepatomas patients. *Clin. Chim. Acta*, **185**, 325-332.

## J

Jacobson, L.D., Golwasser, E., fried, W. and Plzak, L. (1957) Role of the kidney in erythropoiesis. *Nature Lond.*, **179**, 633-634.

Jelkmann, W. (1992) Erythropoietin : structure, control of production and function. *Physiological Reviews*, **72**, 449-489.

Jelkmann, W. (1994) Biology of erythropoietin. *Clin. Investig.*, **72**, S3-S10.

## K

Kabat, E.A. (1982) Contribution of quantitative immunochemistry to knowledge of blood group A, B, H, Le, I and i antigens. *Am. J. Clin. Path.*, **78**, 281-292.

Kamerling, J.P., Gerwig, G.J., Vliegthart, J.F.G. and Clamp, J.R. (1975) Characterization by gas-liquid chromatography-mass spectrometry and proton-magnetic-resonance spectroscopy of pertrimethylsilyl methyl glycosides obtained in the methanolysis of glycoproteins and glycopeptides. *Biochem. J.*, **151**, 491-495.

Katz, R., Cooper, G.W., Gordon, A.S. and Zanjani, E.D. (1968) Studies on the site of production of erythropoietin. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **149**, 120-127.

Kaushal, G. P. and Elbein, A.D. (1993) The use of glycoprotein processing inhibitors to distinguish various mannosidases. *Trends in glycoscience and glycotechnology*, **5**, 209-218.

Kawano, T., Endo, T., Nishimura, R., Mizuochi, T., Mochizuki, M. Kochibe, N. and Kobata, A. (1988) Structural differences found in the sugar chains of eutopic and ectopic free alpha-subunits of human glycoprotein hormone. *Arch. Biochem. Biophys.*, **267**, 787-796.

- Kean, EL (1991) Topographical orientation in microsomal vesicles of the N-acetylglucosaminyl transferase which catalyses the biosynthesis of N-acetylglucosaminyl pyrophosphoryl dolichol and N-acetylglucosaminyl N-acetyl glucosaminyl dolichol. *J. Biol. Chem.*, **266**, 942-946.
- Kellogg, R. H. (1978) La pression barométrique : Paul Bert's hypoxia theory and its critics. *Respir. Physiol.*, **34**, 1-28.
- Kirito, K., Uchida, M., Yamada, M., Miura, Y. and Komatsu, N. (1997) A distinct function of STAT proteins in erythropoietin signal transduction. *J. Biol. Chem.*, **272**, 16507-16513.
- Klein, A., Diaz, S., Ferreira, I., Lamblin, G., Roussel, P. and Manzi, A.E. (1997) New sialic acids from biological sources identified by a comprehensive and sensitive approach : liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry (LC-ESI-MS) of SIA quinoxalinones. *Glycobiology*, **7**, 421-432.
- Kobata, A. (1992) Structures and functions of the sugar chains of glycoproteins. *Eur. J. Biochem.*, **209**, 483-501.
- Koch, K.M., Koene, R.A.P., Messinger, D., Quarder, O. and Scigalla, P. (1995) The use of epoetin beta in anemic predialysis patient with chronic renal failure. *Clinical Nephrology*, **44**, 201-208.
- Kornfeld, R. and Kornfeld, S. (1980) Structure of glycoproteins and their oligosaccharide units. in *Biochemistry of glycoproteins and proteoglycans* (Lennarz W.J., ed) New York and London : Plenum Press, 1-34.
- Kornfeld, R. and Kornfeld, S. (1985) Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Ann. Rev. Biochem.*, **54**, 631-664.
- Koury, M.J. and Bondurant, M.C. (1992) The molecular mechanism of erythropoietin action. *Eur. J. Biochem.*, **210**, 649-663.
- Krantz, S.B. (1991) Erythropoietin. *Blood*, **77**, 419-434.
- Kuratowska, Z., Lewartowski, B. and Michalak, E. (1961) Studies on the Production of erythropoietin by isolated perfused organs. *Blood*, **18**, 527-534.
- L**
- Lacombe, C. et Mayeux, P. (1995) L'érythropoïétine. *Médecine/Sciences*, **11**, 947-955.
- Lai, P.-H., Everett, R., Wangt, F.-F., Arakawa, T. and Goldwasser, E. (1986) Structural characterization of human erythropoietin. *J. Biol. Chem.*, **261**, 3116-3121.
- Lhermitte, M., Lamblin, G., Lafitte, J.-J., Degand, P., Roussel, P. and Mazzuca, M. (1981) Human bronchial-mucus glycoproteins : a comparison between chemical properties and affinity for lectins. *Carbohydr. Res.*, **92**, 333-342.

- Liboi, E., Carroll, M., D'Andrea, A.D. and Mathey-Prevot, B. (1993) Erythropoietin receptor signals both proliferation and erythroid-specific differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 11351-11355.
- Linsley, K.B., Chan, S.-Y., Chan, S., Reinhold, B.B., Lisi, P.J. and Reinhold, V.N. (1994) Applications of electrospray mass spectrometry to erythropoietin N- and O-Linked Glycans. *Analytical Biochemistry*, **219**, 207-217.
- Lis, H., and Sharon, N. (1993) Protein glycosylation structural and functional aspects. *Eur. J. Biochem.*, **218**, 1-27.
- Lloyd, K.O., Kabat, E.A. and Licerio, E. (1968) Immunochemical studies on blood groups. Structures and activities of oligosaccharides produced by alkaline degradation of blood group Lewis<sup>a</sup> substance. Proposed structure of the carbohydrate chains of human blood-group A, B, H, Le<sup>a</sup> and Le<sup>b</sup> substances. *Biochemistry*, **7**, 2976-2990.
- Lodish, H.F. (1988) Transport of secretory and membrane glycoproteins from ER to Golgi. *J. Biol. Chem.*, **263**, 2107-2110.
- Lodish, H.F. and Kong, N. (1984) Glucose removal from N-linked oligosaccharides is required for efficient maturation of certain secretory glycoproteins from the rough endoplasmic reticulum to the golgi complex. *J. Cell. Biol.*, **98**, 1720-1729.
- Lubas, W.A. and Spiro, R.G. (1988) Evaluation of the rôle of rat liver golgi endo- $\alpha$ -D-mannosidase in processing N-linked oligosaccharides. *J. Biol. Chem.*, **263**, 3990-3998.
- ## M
- Mackiewicz, A. and Mackiewicz, K. (1995) Glycoforms of serum  $\alpha$ 1-acid glycoprotein as markers of inflammation and cancer. *Glycoconjugate Journal*, **12**, 241-247.
- Maouche, L., Tournamille, C., Hattab, C., Boffa, G., Cartron, JP. and Chrétien, S. (1991) Cloning of the gene encoding the human erythropoietin receptor. *Blood*, **78**, 2557-2563.
- Marth, J.D. (1996) Complexity in O-linked oligosaccharide biosynthesis engendered by multiple polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases. *Glycobiology*, **6**, 701-705.
- Marti, H. H., Gassmann, M., Wenger, R. H., Kvietikova, I., Morganti-Kossmann, M. C., Kossmann, T., Trentz, O. and Bauer, C. (1997) Detection of erythropoietin in human liquor : intrinsic erythropoietin production in the brain. *Kidney International*, **51**, 416-418.
- Marti, H.H., Wenger, R.H., Rivas, L.A., Straumann, U, Digicaylioglu, M., Henn, V., Yonekawa, Y., Bauer, C. and Gassmann, M. (1996) Erythropoietin gene expression in human, monkey and murine brain. *European Journal of Neuroscience*, **9**, 666-676.
- Matsumoto, S., Ikura, K., Ueda, M. and Sasaki, R. (1995) Characterization of a human glycoprotein (erythropoietin) produced in cultured tobacco cells. *Plant Molecular Biology*, **27**, 1163-1172.

- Maxwell, P.H., Ferguson, D.J.P., Nicholls, L.G., Iredale, J.P., Pugh, C.W., Jonhson, M.H. and Ratcliffe, P.J. (1997) Sites of erythropoietin production. *Kidney International*, **51**, 393-401.
- Mayeux, P., Billat, C and Jacquot, R. (1987) The erythropoietin receptor of rat erythroid progenitor cells characterization and affinity cross-linkage. *J. Biol. Chem.*, **262**, 13985-13990.
- Mayeux, P., Casadevall, N. (1990) L'érythropoïétine. *Technique et Biologie*, **1**, 6-10.
- Mc Farlane, I.J. (1983) Hepatic clearance of serum glycoproteins. *Clin. Sci.*, **64**, 127-135.
- Metcalf, D. (1993) Le contrôle moléculaire de la prolifération et de la différenciation des cellules hématopoïétiques. *C. R. Acad. Sci. Paris, sciences de la vie/life sciences*, **316**, 860-5.
- Moliterno, A. and Spivak, J.L. (1996) Anemia of cancer. Hematologic complications of cancer. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, **10**, 345-363.
- Montreuil, J. (1975) Recent data on the structure of the carbohydrate moiety of glycoproteins. Metabolic and biological implication. *Pure and Appl. Chem.*, **42**, 431-477.
- Montreuil, J. (1980) Primary structure of glycoprotein glycans. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **37**, 157-223.
- Montreuil, J. (1982) Glycoproteins. In *Comprehensive Biochemistry* (Neuberger A., van Deenen L.M., eds), Elsevier Scientific Publishing Compagny, Amsterdam, Oxford, New York, 19 B, Part II, 1-188.
- Montreuil, J. (1984) Spatial conformation of glycans and glycoprotein. *Biol. Cell.*, **51**, 115-132.
- Montreuil, J., Bouquelet, S., Debray, H., Fournet, B., Spik, G., Strecker, G. (1986) Carbohydrate analysis, a practical approach. In *M.F. Chaplin and J.F. Kenedy* (Editors), IRL Press, Oxford, 143.
- Moore, K.L., Eaton, S.F., Lyons, D.E., Lichenstein, H.S., Cummings, R.D. and McEver, R.P. (1994) The P-selectin glycoprotein ligand from human neutrophils displays sialylated, fucosylated, O-linked poly-N-acetyllactosamine. *J. Biol. Chem.*, **269**, 23318-23327.
- Morgan, W.T.J. and Watkins, W.M. (1969) Genetic and biochemical aspects of human blood-group A-, B-, H-, Le<sup>a</sup>- and Le<sup>b</sup>-specificity. *Br. Med. Bull.*, **25**, 30-34.
- Morimoto, K., Tsuda, E., Said Abdu, A., Uchida, E., Hatakeyama, S., Ueda, M. and Hayakawa, T. (1996) Biological and physicochemical characterization of recombinant human erythropoietins fractionated by Mono Q column chromatography and their modification with sialyltransferase. *Glycogonjugate Journal*, **13**, 1013-1020.
- Motoyoshi, F., Kondo, N. and Orii, T. (1990) Appearance of bisected N-acetylglucosamine residue of biantennary sugar chains and decrease of high molecular weight oligosaccharides

of human lymphocytic cell membranes during differentiation. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **54**, 495-499.

## **N**

Naffakh, N. and Danos, O. (1996) Gene transfer for erythropoiesis enhancement. *Molecular Medicine Today*, **8**, 343-348.

Nahri, O.L., Arakawa, T., Aoki, K.H., Elmore, R., Rohede, M.F., Boone, T. and Strickland, T.W. (1991) The effect of carbohydrate on the structure and stability of erythropoietin. *J. Biol. Chem.*, **266**, 23022-23026.

Narasimhan, S., Schachter, H. and Rajalakshmi, S. (1988) Expression of N-acetylglucosaminyltransferase III in hepatic nodules during rat liver carcinogenesis promoted by orotic acid. *J. Biol. Chem.*, **263**, 1273-1281.

Nehrke, K., Hagen, F.K. and Tabak, L.A. (1996) Charge distribution of flanking amino acids influences O-glycan acquisition *in vivo*. *J. Biol. Chem.*, **12**, 7061-7065.

Nimtze, M., Martin, W., Wray, V., Klöppel, K. D., Augustin, J. and Conradt, H. S. (1993) Structures of sialylated oligosaccharides of human erythropoietin expressed in recombinant BHK-21 cells. *Eur. J. Biochem.*, **213**, 39-56.

Noguchi, A., Mukuria, C.J., Suzuki, E. and Naiki, M. (1995) Immunogenicity of N-glycolylneuraminic acid-containing carbohydrate chains of recombinant human erythropoietin expressed in Chinese Hamster Ovary cells. *J. Biochem.*, **117**, 59-62.

Noguchi, A., Mukuria, C.J., Suzuki, E., Naiki, M. (1996) Failure of human immunoresponse to N-glycolylneuraminic acid epitope contained in recombinant human erythropoietin. *Nephron*, **72**, 599-603.

Noguchi, C.T., Bae, K.S., Chin, K., Wada, Y., Schechter, A.N. and Hankins, W.D. (1991) Cloning of the human erythropoietin receptor gene. *Blood*, **78**, 2548-2556.

## **O**

Ohashi, H., Miyata, M., Ishii, Y., Takeuchi, M., Takasage, A., Suzuki, T. and Sudo, T. (1989) Purification and characterization of recombinant human erythropoietin expressed in human Cervix Carcinoma HeLa cells. *Trends Anim. Cell Culture Technol.*, **1**, 115-120.

## **P**

Peces, R., de la Torre, M., Alcazar, R. and Urra, J.M. (1996) Antibodies against recombinant human erythropoietin in a patient with erythropoietin-resistant anemia. *The New England Journal of Medicine*, **7**, 523-524.

Pless, D.D. and Lennarz, W.J. (1977) Enzymatic conversion of proteins to glycoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 134-138.

Podolsky, D.K. (1985) Oligosaccharide structures of human colonic mucin. *J. Biol. Chem.*, **260**, 8262-8271.

Poisson, D. (1995) Eprex : historique et développement. *Nouv. Rev. Fr. Hématol.*, **37**, s1-s3.

## R

Rahbek-Nielsen, H., Roepstorff, P., Reischl, H., Wozny, M., Koll, H. and Haselbeck, A. (1997) Glycopeptide profiling of human urinary erythropoietin by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, **32**, 948-958.

Recny, M. A., Scoble, H. A. and Kim, Y. (1987) Structural characterization of natural human urinary and recombinant DNA-derived erythropoietin. Identification of des-Arginine 166 erythropoietin. *J. Biol. Chem.*, **262**, 17156-17163.

Reitman, M.L, Trowbridge, I.S. and Kornfeld, S. (1982) A lectin-resistant mouse lymphoma cell line is deficient in glucosidase II, a glycoprotein-processing enzyme. *J. Biol. Chem.*, **257**, 10357-10363.

Reuter, G. and Schauer, R. (1994) Determination of sialic acids. *Methods in Enzymology*, **230**, 168-199.

Rice, K.G., Takahashi, N., Namiki, Y., Tran, A.D., Lisi, P.J. and Lee, Y.C. (1992) Quantitative mapping of the N-linked sialyl oligosaccharides of recombinant erythropoietin : combination of direct High-Performance Anion-Exchange Chromatography and 2-Aminopyridine derivatization. *Analytical Biochemistry*, **206**, 278-287.

Rich, I.N. (1986) A role for the macrophage in normal hemopoiesis. II. Effect of varying physiological oxygen tensions on the release of hemopoietic growth factors from bone-marrow-derived macrophages *in vitro*. *Exp. Hematol.*, **14**, 746-751.

Rich, I.N., Heit, W. and Kubanek, B. (1982) Extrarenal erythropoietin production by macrophage. *Blood*, **60**, 1007-1018.

Rocheman, M. (1987) L'érythropoïétine. *Biofutur*, **1**, 47-53.

Roth, J., Douglas, J.T., Weinstein, J., Paulson, J.C., Greenwell, P. and Watkins, W.M. (1986) Differential subcompartmentation of terminal glycosylation in the golgi apparatus of intestinal absorptive and goblet cells. *J. Biol. Chem.*, **261**, 14307-14312.

Roivis, L., Anderson, B., Kabat, E.A., Grueso, F. and Liao, J. (1973) Structures of oligosaccharides produced by base-borohydride degradation of human ovarian cyst blood group H, Le<sup>b</sup> and Le<sup>a</sup> active glycoproteins. *Biochemistry*, **12**, 5340-5354.

Rush, R. S., Derby, P.L., Smith, D.M., Merry, C., Rogers, G., Rohde, M.F. and Katta, V. (1995) Microheterogeneity of erythropoietin carbohydrate structure. *Analytical Chemistry*, **67**, 1442-1452.

Rush, R. S., Derby, P.L., Strickland, T.W. and Rohde, M.F. (1993) Peptide mapping and evaluation of glycopeptide microheterogeneity derived from Endoproteinase digestion of erythropoietin by Affinity High-Performance Capillary Electrophoresis. *Anal. Chem.*, **65**, 1834-1842.

## S

Sasaki, H., Bothner, B., Dell, A. and Fukuda, M. (1987) Carbohydrate structure of erythropoietin expressed in Chinese Hamster Ovary cells by a human erythropoietin cDNA. *J. Biol. Chem.*, **262**, 12059-12076.

Sasaki, H., Ochi, N., Dell, A. and Fukuda, M. (1988) Site specific glycosylation of human recombinant erythropoietin : analysis of glycopeptides or peptides at each glycosylation site by Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry. *Biochemistry*, **27**, 8618-8626.

Sasaki, K., Kurata-Miura, K., Ujita, M., Angata, K., Nakagawa, S., Sekine, S., Nishi, T. and Fukuda, M. (1997) Expression cloning of cDNA encoding a human  $\beta$ -1,3-N-acetylglucosaminyltransferase that is essential for poly-N-acetyllactosamine synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 14294-14299.

Savvidou, G., Klein, M., Grey, A.A., Dorrington, K.J. and Carver, J.P. (1984) Possible role for peptide oligosaccharide interactions in differential oligosaccharide processing at asparagine-107 of the light chain and asparagine-297 of the heavy chain in a monoclonal IgG<sub>1k</sub>. *Biochemistry*, **23**, 3736-3740.

Sawyer, S.T., Krantz, S.B. and Goldwasser, E. (1987) Binding and receptor-mediated endocytosis of erythropoietin in friends virus-infected erythroid cells. *J. Biol. Chem.*, **262**, 5554-5562.

Schachter, H. (1986) Biosynthetic controls that determine the branching and microheterogeneity of protein bound oligosaccharides. *Biochem. Cell. Biol.*, **64**, 163-181.

Schachter, H. (1991) The « yellow brick road » to branched complex N-glycans. *Glycobiology*, **1**, 453-461.

Schachter, H. and Brockhausen, I. (1992) The biosynthesis of serine (threonine)-N-acetylgalactosamine-linked carbohydrate moieties. In *Glycoconjugate : composition, structure and function* (Allen H.J. and Kisailus E.C. eds) Marcel Dekker Inc, New York, 263-332.

Schauer, R. (1987) Metabolism of O-acetyl groups of sialic acids. *Methods in Enzymology*, **138**, 611-626.

Schuster, S.J., Wilson, J.H., Erslev, A.J. and Caro, J. (1987) Physiologic regulation and tissue localization of renal erythropoietin messenger RNA. *Blood*, **70**, 316-318.

Semenza, G.L., Koury, S.T., Nejfelt, M.K., Gearhart, J.D. and Antonarakis, S.E. (1991) Cell-type-specific and hypoxia-inducible expression of the human erythropoietin gene in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 8725-8729.

Semenza, G.L., Wang, G.L. (1992) A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 5447-5454.

Shanks, J. H., Hill, C.M., Lappin, T.R.J. and Maxwell, A.P. (1996) Localization of erythropoietin gene expression in proximal renal tubular cells detected by digoxigenin-labelled oligonucleotide probes. *Journal of Pathology*, **179**, 283-287.

Sharon, N. and Lis, H. (1989) Lectins as cell recognition molecules. *Science*, **246**, 227-274.

Shrogen, R., Gerken, T.A. and Jentoft, N. (1989) Role of glycosylation on the conformation and chain dimensions of O-linked glycoproteins : light-scattering studies of ovine submaxillary mucin. *Biochemistry*, **28**, 5525-5536.

Snider, M. D. (1984) In *Biology of carbohydrates* (Ginburg V. and Robbins P.W., eds) John Wiley and sons, New York, **2**, 199-288.

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

Spielman, J., Hull, S.R., Sheng, Z., Kanterman, R., Bright, A. and Carraway, K.L. (1988) Biosynthesis of a tumor cell surface sialomucin. Maturation and effects of monensin. *J. Biol. Chem.*, **263**, 9621-9629.

Spik, G., Legrand, D., Leveugle, B., Mazurier, J., Mikogami, J., Montreuil, J., Pierce, A., Rochard, E. (1993) Binding properties of different lactotransferrins to human lactoferrin receptor (edited by Renner R. and Sawatzki G.). *New perspectives in infant nutrition* (Symposium Antwerp 1992) Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.

Spiro, R.G. (1973) Glycoproteins. *Adv. Prot. Chem.*, **27**, 349-467.

Spivak, J. L. and Hogans, B. (1989) The *in vitro* metabolism of recombinant human erythropoietin in the rat. *Blood*, **73**, 90-99.

## T

Takeuchi, M. and Kobata, A. (1991) Structures and functional roles of the sugar chains of human erythropoietins. *Glycobiology*, **1**, 337-346.

Takeuchi, M., Inoue, N., Strickland, T.W., Kubota, M., Wada, M., Shimizu, R., Hoshi, S., Kozutsumi, H., Takasaki, S. and Kobata, A. (1989) Relationship between sugar chain structure and biological activity of recombinant human erythropoietin produced in Chinese Hamster Ovary cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 7819-7822.

Takeuchi, M., Takasaki, S., Miyazaki, H., kaato, T., Hoshit, S., Kochibe, N. and Kobata, A. (1988) Comparative study of the asparagine-linked sugar chains of human erythropoietins purified from urine and the culture medium of recombinant Chinese Hamster Ovary cells. *J. Biol. Chem.*, **263**, 3657-3663.



Takeuchi, M., takasaki, S., Shimada, M. and Kobata, A. (1990) Role of sugar chains in the *in vitro* biological activity of human erythropoietin produced in recombinant Chinese Hamster Ovary cells. *J. Biol. Chem.*, **265**, 12127-12130.

Todokoro, K., Kanazawa, S., Amanuma, H. and Ikawa, Y. (1987) Specific binding of erythropoietin to its receptor on responsive mouse erythroleukemia cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 4126-4130.

Treuheit, M.J., Costello, C.E. and Halsall, H.B. (1992) Analysis of the five glycosylation sites of human alfa 1-acid glycoprotein. *Biochem. J.*, **283**, 105-112.

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**, 5646-5654.

Tsuda, E., Kawanishi, G., Ueda, M., Masuda, S. and Sasaki, R. (1990) The role of carbohydrate in recombinant human erythropoietin. *Eur. J. Biochem.*, **188**, 405-411.

## V

Van Dijk, W., Havenaar, E.C. and Brinkman-Van Der Linden, E.C.M. (1995)  $\alpha$ 1-acid glycoprotein (orosomucoïd) : pathophysiological changes in glycosylation in relation to its function. *Glycoconjugate Journal*, **12**, 227-233.

Van Halbeek, H., Dorland, L., Vliegthart, J.F.G., Kochetkov, N.K., Arbatski, N.P. and Derevitskaya, V.A. (1982) Characterization of the primary structure and the microheterogeneity of the carbohydrate chains of porcine blood-group H substance by 500 <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy. *Eur. J. Biochem.*, **127**, 21-29.

Van Praagh, E. (1996) Erythropoïétine et sport. *Biofutur*, **155**, 28-30.

Varet, B. (1995) L'érythropoïétine : quel avenir ? *Médecine/Sciences*, **11**, 943-945.

Varet, B., Casadevall, N., Lacombe, C. (1988) L'érythropoïétine. *Médecine/Sciences*, **6**, 366-372.

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

Varki, A. and Diaz, S. (1984) The release and purification of sialic acids from glycoconjugate methods to minimize the loss of O-acetyl groups. *Anal. Biochem.*, **137**, 236-247.

## W

Warner, T.G., Chang, J., Ferrari, J., Harris, R., McNerney, T., Bennett, G., Burnier, J. and Sliwowski, M.B. (1993) Isolation and properties of a soluble sialidase from the culture fluid of Chinese Hamster Ovary cells. *Glycobiology*, **3**, 455-463.

Wasley, L.C., Timony, G., Murtha, P., Stoudemire, J., Dorner, A.J., Caro, J., Krieger, M. and Kaufman, R.J. (1991) The importance of N-linked oligosaccharides for the biosynthesis and *in vitro* and *in vivo* biologic activities of erythropoietin. *Blood*, **77**, 2624-2632.

Watkins, W.M. (1980) Biochemistry and genetics of the ABO, Lewis and P blood-group systems. In *Advances in human genetics* (Harris H and Hirschhorn K, eds). Plenum Publishing Co, New York, **10**, 1-136 and 379-385.

Watkins, W.M. (1987) Biochemical genetics of blood group antigens : retrospect and prospect. *Biochem. Soc. Trans.*, **15**, 620-624.

Watson, E. and Yao, F. (1993) Capillary electrophoresis separation of human recombinant erythropoietin (r-HuEPO) Glycoforms. *Analytical Biochemistry*, **210**, 389-393.

Watson, E., Bhide, A. and Van Halbeek, H. (1994) Structure determination of the intact major sialylated oligosaccharide chains of recombinant human erythropoietin expressed in Chinese Hamster Ovary cells. *Glycobiology*, **4**, 227-237.

Weber, W., Steube, K., Gross, V., Tran-Thi, T.-A., Decker, K., Gerok, W. and Heinrich, P.C. (1985) Unglycosylated rat alpha 1-proteinase inhibitor has a six-fold shorter plasma half-life than the mature glycoprotein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **162**, 630-635.

Wen, D., Boissel, JP., Showers, M., Ruch, B.C. and Bunn, H. F. (1994) Erythropoietin structure-function relationships identification of functionally important domains. *J. Biol. Chem.*, **269**, 22839-22846.

Woodward, H.D., Ringler, N.J., Selvakumar, R., Simet, I.M., Bhavanandan, V.P. and Davidson, E.A. (1987) Deglycosylation studies on tracheal mucin glycoproteins. *Biochemistry*, **26**, 5315-5322.

## Y

Yamaji, R., Okada, T., Moriya, M., Naito, M., Tsuruo, T., Miyatake, K. and Nakano, Y. (1996) Brain capillary endothelial cells express two forms of erythropoietin receptor mRNA. *Eur. J. Biochem.*, **239**, 494-500.

Yanagi, H., Yoshima, T., Ogawa, I. and Okamoto, M. (1989) Recombinant human erythropoietin produced by Namalwa cells. *DNA*, **8**, 419-427.

Youngs, A., Chang, S.C., Dwek, R.A. and Scragg, I.G. (1996) Site-specific glycosylation of human immunoglobulin G is altered in four rheumatoid arthritis patients. *Biochem. J.*, **314**, 621-630.

Youssoufian, H., Longmore, G., Neumann, D., Yoshimura, A. and Lodish, H.F. (1993) Structure, function and activation of the erythropoietin receptor. *Blood*, **81**, 2223-2236.

## Z

Zanetta, J.-P., Timmerman, P. and Leroy, Y. (sous presse) Gas-liquid chromatography of the heptafluorobutyrate derivatives of the O-methyl-glycosides on capillary columns : a

method for the quantitative determination of the monosaccharide composition of glycoproteins and glycolipids. *Glycobiology*.

