

N° d'ordre : 4117

**UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE I  
ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE ET SANTE**

# **THESE**

présentée par

**ESTELLE GARENAUX**

Pour l'obtention du grade de  
**Docteur de L'Université**  
**Sciences de la vie et de la santé**  
**Specialité : Biochimie**

**Variabilité structurale des glycoconjugués.  
Etude réalisée chez les Hyménoptères, les  
Oiseaux et les Protistes parasites.**

Soutenue le 13 décembre 2007 devant le jury suivant :

Président : **Professeur Philippe Delannoy**

Rapporteurs : **Docteur Rosella Mollicone**  
: **Professeur Iain B. Wilson**

Examineurs : **Dr José O. Previato**  
: **Dr Jean-Claude Michalski**  
: **Dr Yann Guérardel**

Je tiens à exprimer ma gratitude à :

Monsieur le Professeur Philippe Delannoy qui me fait le plaisir de présider le jury de cette thèse,

Madame le Docteur Rosella Mollicone et Monsieur le Professeur Iain B. Wilson qui ont accepté de juger ce mémoire,

Monsieur le Docteur Yann Guérardel, Monsieur le Docteur Jean-Claude Michalski et Monsieur le Professeur José Osvaldo Previato qui ont bien voulu examiner ce travail.

Je remercie le Docteur Jean-Claude Michalski qui m'a accueillie au sein de son laboratoire il y a quatre ans et qui a toujours suivi mon travail avec intérêt.

Je tiens à remercier tout particulièrement le Docteur Yann Guérardel qui m'a promptement accueillie dans son groupe. Merci d'avoir encadré mon apprentissage scientifique, de m'avoir conseillée et de m'avoir offert de multiples opportunités d'enrichissements tant scientifiques que personnels.

Mes remerciements s'adressent également à :

Monsieur le Professeur Ralph T. Schwarz, pour m'avoir fait découvrir et apprécier le monde de la parasitologie et d'avoir toujours montré un enthousiasme sans limite au cours de notre collaboration,

Monsieur le Professeur René Cacan, et Monsieur le Docteur Gérard Strecker pour m'avoir fait profiter de leurs connaissances intarissables.

J'adresse mes remerciements les plus sincères à :

Bernadette Coddeville, Adeline Page, Frédéric Chirat, pour leurs nombreux conseils et leur constante disponibilité tout au long de ma thèse.

Je remercie également Emmanuel Maes et Xavier Trivelli, mes camarades de bureau, pour leur soutien, leur réconfort, leur légendaire bonne humeur et leurs délicieuses pauses culinaires.

<b>INTRODUCTION GENERALE</b> .....	4
<b>LEGENDE</b> .....	6
<b><u>Partie A – Diversité structurale des O-glycannes de type mucine</u></b>	
<b>Introduction</b> .....	7
<b>I – Généralités sur les O-Glycannes de type mucine</b> .....	8
1. Définition .....	8
2. Structure des O-Glycannes.....	8
2.1 Les O-glycannes des Mammifères .....	9
2.2 La diversité des structures O-glycanniques .....	12
2.3 Spécificité d'espèces des O-glycannes.....	16
2.4 Rôle de la O-glycosylation.....	17
<b>II – Premiers travaux : les potentiels de O-glycosylation de la guêpe commune <i>Vespa germanica</i> et du frelon <i>Vespa cabro</i></b> .....	19
1. Introduction .....	19
2. Résultats .....	20
<b>III – Seconds travaux : Nouvelle méthode de purification d'oligosaccharides sulfatés</b> .....	48
1. Introduction .....	48
2. Résultats .....	48
2.1 Méthode simplifiée de purification des O-glycannes sulfatés.....	48
2.2 Application à la purification de structures sulfatées à partir d'ovomucines .....	74
<b>IV – Conclusion</b> .....	84

## **Partie B – Diversité structurale des glycoconjugués microbiens**

<b>Introduction</b> .....	85
<b>I – Généralités sur la N-glycosylation</b> .....	88
<b>1. Définition</b> .....	88
<b>2. Biodiversité des structures N-glycanniques chez les eucaryotes</b> .....	89
<b>3. Biosynthèse des N-glycannes</b> .....	93
3.1 Assemblage du précurseur oligosaccharidique : le cycle des dolichols.....	93
3.2 Transfert du précurseur oligosaccharidique : le complexe de l'oligosaccharyl transférase (OST) .....	96
3.3 Le contrôle qualité N-glycane-dépendant des protéines .....	96
3.4 Obtention des structures hybrides ou complexes .....	97
<b>4. Conservation du cycle des dolichols chez les eucaryotes</b> .....	101
4.1 Propriétés des glycosyltransférases de type ALG .....	101
4.2 Diversité des précurseurs oligosaccharidiques synthétisés .....	102
4.3 Propriétés de l'OST .....	102
<b>II – Premier modèle d'étude : les microsporidies <i>Encephalitozoon cuniculi</i> et <i>Antonospora locustae</i> ...</b>	104
<b>1. Généralités</b> .....	104
1.1 Les microsporidies .....	104
1.1.1 <i>Encephalitozoon cuniculi</i> .....	105
1.1.2 <i>Antonospora locustae</i> .....	106
1.2 La glycosylation chez les microsporidies.....	106
1.3 La glycosylation chez les levures.....	107
1.3.1 La N-glycosylation .....	107
1.3.2 La O-mannosylation.....	109
1.3.3 La glypiation .....	110
<b>2. Résultats</b> .....	111
<b>3. Conclusion</b> .....	112

<b>III - Second modèle d'étude : <i>Toxoplasma gondii</i></b> .....	113
<b>1. Généralités</b> .....	113
1.1 <i>T. gondii</i> et la toxoplasmose.....	113
1.2 Le cycle lytique du tachyzoïte.....	114
1.2.1 Invasion .....	114
1.2.2 Formation de la vacuole parasitophore .....	115
1.2.3 Association avec le réticulum endoplasmique et les mitochondries.....	115
1.2.4 Multiplication du parasite.....	115
1.2.5 Sortie de la cellule hôte .....	115
1.3 Transactions hôte/parasite .....	116
1.3.1 Les voies de sécrétion chez <i>T.gondii</i> .....	116
1.3.2 Importation de matériel de la cellule hôte.....	116
1.4 <i>T. gondii</i> et glycosylation .....	117
<b>2. Résultats</b> .....	118
2.1 Présentation des résultats .....	118
2.2 Etude préliminaire : profil des glycosphingolipides de <i>T. gondii</i> .....	156
<b>3. Conclusion</b> .....	160
<b>IV – Conclusion</b> .....	164
<b>CONCLUSION GENERALE</b> .....	166
<b>REFERENCES</b> .....	170

# Introduction générale

---

Le terme glycosylation renvoie à des molécules très diverses : glycoprotéines, glycolipides, polysaccharides ou oligosaccharides libres. Ces molécules sont impliquées dans de nombreuses fonctions biologiques : réserve, structure (parois des bactéries et des végétaux ou matrice extracellulaire des cellules eucaryotes), interactions intercellulaires.

Chacune de ces formes de glycosylation présente une incroyable diversité structurale. En effet, la nature des monosaccharides les composant (anomérie, conformation, configuration), leur séquence, la position des liaisons (branchement) et les éventuelles substitutions (sulfates, phosphates...) sont autant de facteurs permettant de générer un nombre extraordinaire d'isomères. De plus, les structures glycanniques sont synthétisées par ajout séquentiel de monosaccharides par des enzymes particulières, les glycosyltransférases. Chacune de ces enzymes présente une spécificité de substrats (donneurs et accepteurs), ainsi qu'une spécificité de liaison (anomérie et position). Or l'équipement enzymatique est fonction à la fois de l'espèce, de l'individu, du type cellulaire ou tissulaire, et de l'état physiopathologique considéré. Aussi, en fonction de la source biologique considérée, les structures glycanniques peuvent être extrêmement diverses. Il est donc impossible de déterminer la nature des structures glycanniques présentes dans un échantillon sans effectuer une analyse structurale fine.

Diverses formes de glycosylation des protéines se distinguent en fonction du lien covalent unissant la partie saccharidique à la chaîne polypeptidique. Chez les eucaryotes, la N-glycosylation est définie par la liaison d'un résidu de N-acétylglucosamine (GlcNAc) à un résidu d'asparagine (Asn) (GlcNAc $\beta$ -Asn). Il existe par ailleurs différentes formes de O-glycosylation des protéines, en fonction du monosaccharide impliqué dans la liaison à l'axe peptidique (GalNAc-O-Ser/Thr, Xyl-O-Ser, Fuc-O-Ser/Thr).

Les travaux exposés dans ce rapport portent essentiellement sur l'étude de la O-glycosylation de type mucine ainsi que sur la N-glycosylation, correspondant aux modifications post-traductionnelles majoritaires chez les eucaryotes.

La première partie de mes travaux, exposée dans la partie A, a consisté à étudier la diversité des structures O-glycanniques d'insectes. En effet, la pauvreté des structures décrites jusqu'à présent chez ces organismes, en contraste avec les nombreuses espèces d'insectes répertoriées, a motivé l'étude des structures O-glycanniques portées par les glycoprotéines salivaires de deux espèces d'insectes, la guêpe commune *Vespula germanica* et le frelon *Vespa cabro*.

D'autre part, l'opportunité de travailler sur différentes sources de mucines portant des O-glycannes sulfatés a permis le développement d'une méthode rapide et spécifique, facilitant la purification et la caractérisation de structures O-glycanniques sulfatées.

La seconde partie de mes travaux, résumée dans la partie B, portait initialement sur l'étude des profils de N-glycosylation de différents parasites intracellulaires obligatoires. Le contexte de cette étude est défini par l'étude de la conservation du processus de N-glycosylation au cours de l'évolution. Quel que soit l'organisme eucaryote considéré, le processus de N-glycosylation est initié dans le réticulum endoplasmique par la biosynthèse d'un oligosaccharide précurseur lié à un lipide lors d'une voie métabolique particulière: le cycle des dolichols. Cette biosynthèse s'effectue grâce à l'action séquentielle de glycosyltransférases de type ALG (Asparagine Linked Glycosylation). L'établissement du répertoire des enzymes ALG présentes au sein d'un organisme à partir de recherche *in silico* permet en théorie de prédire la nature du précurseur N-glycannique synthétisé. Par ailleurs, de la comparaison des répertoires d'enzymes de type ALG chez différents organismes allant des protozoaires aux mammifères, ressort finalement la conception d'une évolution régressive à partir d'ancêtres communs possédant toutes les enzymes de type ALG (Samuelson *et al.*, 2005). Si la confrontation des données expérimentales et des prédictions bioinformatiques a pu être effectuée et vérifiée pour de nombreux organismes, elle n'a pu se faire chez les parasites intracellulaires obligatoires, faute de données structurales. Aussi, nous avons choisi d'étudier les profils de N-glycosylation de *Toxoplasma gondii*, appartenant au phylum des Apicomplexa, et des microsporidies *Encephalitozoon cuniculi* et *Antonospora locustae*, chacun de ces parasites étant considérés comme des organismes modèles dans leur phylum.

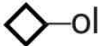

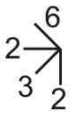










La majorité des résultats est présentée sous forme de manuscrits, rédigés en anglais. Dans le cas des mucines sulfatées et de l'étude du profil de glycosylation de *T. gondii*, les résultats présentés dans les manuscrits sont complétés par des travaux préliminaires.



Liste des monosaccharides communs et leur abréviation

<i>Monosaccharide</i>	<i>Abréviation</i>
<i>N-Acétylglucosamine</i>	<i>GlcNAc</i>
<i>N-Acétylgalactosamine</i>	<i>GalNAc</i>
<i>Mannose</i>	<i>Man</i>
<i>Glucose</i>	<i>Glc</i>
<i>Xylose</i>	<i>Xyl</i>
<i>Fucose (6-desoxygalactose)</i>	<i>Fuc</i>
<i>Galactose</i>	<i>Gal</i>
<i>Acide 5-N-Acétylneuraminique</i>	<i>NeuAc</i>
<i>Acide glucuronique</i>	<i>GlcA</i>

*Légende des symboles utilisés dans la partie A*  
*Diversité structurale des O-glycannes de type mucine*

 -ol	GalNAc-ol		$\beta$ GalNAc	<p>Liaisons</p> 
	$\beta$ GlcNAc		$\alpha$ GalNAc	
	$\beta$ Gal		$\beta$ GlcNAc	
	$\alpha$ NeuAc		$\alpha$ GlcNAc	
	$\alpha$ Fuc		$\alpha$ Kdn	
	$\alpha$ Gal		$\beta$ GlcUA	

# Partie A

## Diversité structurale des O-glycannes de type mucine

La connaissance des structures des chaînes O-glycanniques est essentielle pour la compréhension des rôles et des fonctions de la O-glycosylation. De plus, l'existence d'une spécificité d'espèce des structures O-glycanniques, ainsi que l'exploration des rôles liés à cette diversité structurale a fortement motivé leur étude chez des organismes aussi variés que les poissons, les parasites, les amphibiens ou les oiseaux. Cette diversité structurale semble sans limite, au-delà de la simple description, ces observations suscitent de nombreuses questions quant aux origines d'une telle diversité et aux implications biologiques liées. Au contraire de l'extrême diversité des O-glycannes observée chez les poissons et les amphibiens, les insectes semblent posséder une O-glycosylation beaucoup plus simple, particulièrement peu variée, en contraste avec le nombre important d'espèces décrites. Initialement, seules les structures Gal( $\beta$ 1,3)GalNAc-Ser/Thr et GalNAc-Ser/Thr avaient été décrites chez plusieurs espèces d'insectes (Kramerov *et al.*, 1996; Lopez *et al.*, 1999). Une première étude réalisée à partir de glycoprotéines salivaires nous a permis de démontrer que ces motifs pouvaient être substitués chez la guêpe commune (*Vespula germanica*) par des groupements phosphoéthanolamine (Maes *et al.*, 2005). La suite de mes travaux a consisté à compléter cette étude, dans le but de mettre en évidence d'éventuelles structures minoritaires, plus complexes que les structures décrites précédemment. De plus, une étude similaire a été conduite chez le frelon (*Vespa crabro*). Ces deux espèces étant proches phylogénétiquement, il était intéressant de comparer les profils de O-glycosylation de ces deux insectes.

D'autre part, au cours de mes travaux, j'ai eu l'opportunité de travailler sur différentes sources de O-glycannes sulfatés. En effet, les mucines recouvrant les épithéliums présentent souvent des charges négatives portées par des groupements sulfates ou des acides sialiques qui leur confèrent leurs propriétés physico-chimiques de viscosité. Dans des pathologies telles que la mucoviscidose ou le cancer, l'altération des O-glycannes de type mucine peut se traduire par une surexpression de motifs sulfatés ou sialylés. La compréhension des rôles des mucines ou la caractérisation de marqueurs de tumorigenèse spécifiques nécessite une analyse structurale fine, permettant de comparer sans ambiguïté les profils de O-glycosylation de tissus sains et pathologiques, incluant en particulier la description de motifs sulfatés ou sialylés. Une telle démarche nécessite le développement de méthodes de purification et d'analyse simples, fiables et sensibles, compatibles avec l'analyse de composés O-glycanniques chargés, substitués par des acides sialiques ou des groupements sulfates. Nous avons ainsi développé une méthode de purification, rapide et spécifique, facilitant la purification et la caractérisation de structures O-glycanniques sulfatées isolées de mucines.

# I - Généralités

## 1. Définition

La O-glycosylation dans son sens large définit la liaison d'un oligosaccharide sur un polypeptide *via* une liaison O-glycosidique. Il existe différents types de O-glycosylation, certains types étant limités à des espèces, des tissus, ou des polypeptides particuliers. En effet, la O-glycosylation peut impliquer la liaison d'un unique résidu de N-acétylglucosamine sur des protéines cytoplasmiques ou nucléaires, ou une unité de mannose, de fucose ou de N-acétylgalactosamine. La plus fréquente, répandue dans tout le monde animal, implique la liaison d'un résidu de N-acétylgalactosamine en  $\alpha$  sur un acide aminé hydroxylé, sérine (Ser) ou thréonine (Thr). Nous ne retiendrons que cette dernière, qui implique particulièrement une famille de macromolécules contenant des segments peptidiques riches en Ser et Thr, les mucines. Ces macromolécules peuvent porter jusqu'à une centaine d'oligosaccharides différents, la partie O-glycannique pouvant ainsi représenter jusqu'à 80% du poids moléculaire d'une mucine. Ainsi, ces oligosaccharides ont été nommés "O-glycannes de type mucines", ou simplement O-glycannes.

De nombreuses glycoprotéines solubles et membranaires peuvent également être O-glycosylées. Les structures oligosaccharidiques impliquées sont généralement plus courtes, moins diversifiées car restreintes à des noyaux de type 1 ou 2 (Figure 2). Par ailleurs, elles sont beaucoup moins abondantes et souvent liées à des résidus de Ser ou Thr particuliers.

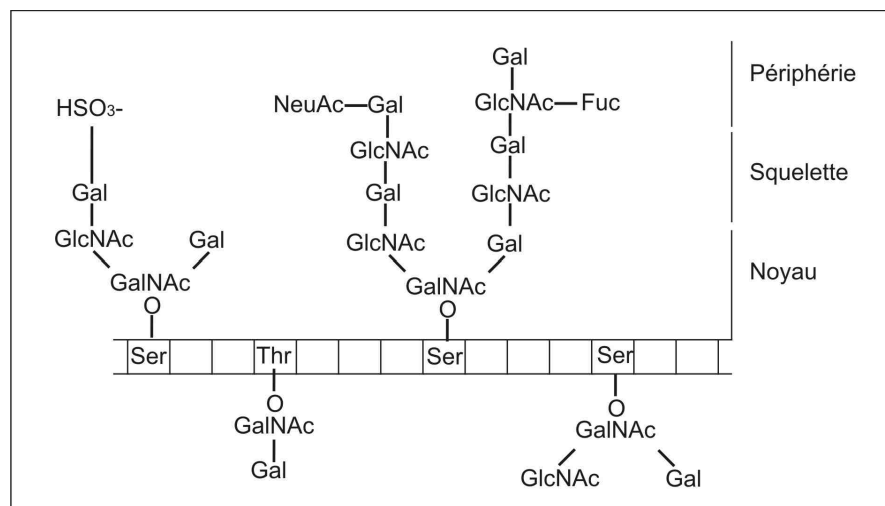
## 2. Structures des O-glycannes

La taille d'un O-glycane peut varier selon la protéine considérée de un à une vingtaine de monosaccharides. La nature des monosaccharides impliqués (anomérie, conformation, configuration), leur séquence, la position des liaisons (branchement) et les éventuelles substitutions (sulfates, phosphates...) sont autant de facteurs permettant de générer une hétérogénéité structurale extrême. De fait, plusieurs centaines de O-glycannes distincts ont été décrits dans l'ensemble du règne animal, le seul dénominateur commun à ces composés étant la présence d'un résidu de GalNAc à leur extrémité réductrice.

## 2.1 Les O-glycannes de Mammifères

La structure des O-glycannes a principalement été étudiée chez l'homme et chez quelques autres espèces de mammifères, surtout à partir des mucines excrétées. Les O-glycannes de Mammifères sont généralement constitués de résidus de Gal, GalNAc, NeuAc et Fuc. Les résidus de Gal, GalNAc et GlcNAc peuvent éventuellement être sulfatés, contribuant ainsi à l'acidification des structures O-glycanniques.

Alors que la N-glycosylation débute dans le réticulum endoplasmique par le pré-assemblage d'un oligosaccharide qui sera transféré en bloc sur la protéine nouvellement synthétisée, la O-glycosylation repose exclusivement sur l'addition séquentielle par des glycosyltransférases golgiennes de monosaccharides à partir de glycosyl-nucléotides donneurs. En dépit de leur complexité apparente due à une grande variabilité structurale, les chaînes O-glycanniques se composent en trois régions distinctes. Ces régions correspondent en fait aux différentes étapes du processus de O-glycosylation se déroulant dans les différents saccules golgiens et dans le réseau transgolgien : le noyau (initiation), le squelette (élongation), et la périphérie (fin de synthèse des glycannes), pouvant éventuellement présenter les antigènes de groupe sanguin (Figure 1) (Hounsell & Feizi, 1982).

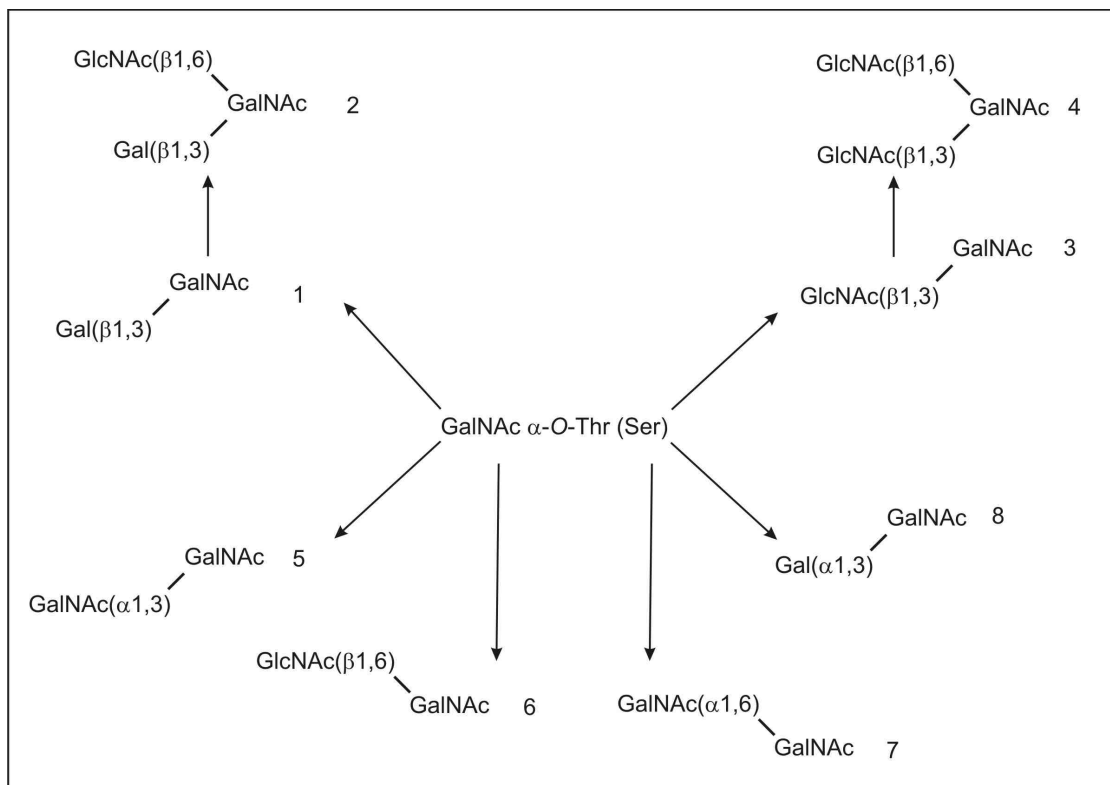


**Figure 1** : D'après Roussel P. & Lamblin G., 1996.

Cette rationalisation de la structure des O-glycannes s'applique principalement aux O-glycannes de mammifères et a permis d'appréhender efficacement la biosynthèse des O-glycannes chez l'homme. Toutefois, l'appréhension des structures O-glycanniques chez des organismes plus exotiques limite rapidement l'utilisation de ce système descriptif.

### *Le noyau ou core ou partie centrale*

La seule réaction commune à la biosynthèse de tous les O-glycannes consiste en l'étape d'initiation, soit à la fixation du premier résidu de GalNAc sur un acide aminé hydroxylé de la protéine qui se déroule dans le cis-Golgi. Une fois ce résidu de GalNAc fixé, différentes glycosyltransférases peuvent agir et impliquer la synthèse de différents noyaux (Figure 2). Certaines structures sont ubiquitaires tandis que d'autres sont observées plus rarement. Les cores 1,2,3 et 4 ont notamment été isolés des mucines intestinales et coliques de rat (Carlsson *et al.*, 1978; Brockhausen *et al.*, 1995), des mucines gastriques et respiratoires humaines (Hanisch *et al.*, 1993; Klein *et al.*, 1988), ou encore des kystes ovariens humains (Mutsaers *et al.*, 1986). Les autres noyaux sont beaucoup moins fréquents. Les noyaux 5 et 6 ont été caractérisés dans le méconium humain (Hounsell *et al.*, 1985; Capon *et al.*, 1989) et dans la mucine sous-maxillaire bovine (Savage *et al.*, 1990), tandis que les noyaux 7 et 8 ont été mis en évidence au niveau des mucines sous-maxillaires bovines (Martensson *et al.*, 1998) et bronchiques humaines (Van Halbeek *et al.*, 1994).



**Figure 2:** Principaux noyaux des chaînes O-glycanniques de type mucine.

### ***L'élongation***

Le squelette est constitué de l'enchaînement, linéaire ou branché, d'unités disaccharidiques. Chez les mammifères en général et l'homme en particulier, elle résulte principalement de l'addition d'unités disaccharidiques de type 1 : Gal( $\beta$ 1-3)GlcNAc $\beta$  ou de type 2 : Gal( $\beta$ 1-4)GlcNAc $\beta$ . L'élongation débute sur n'importe lequel des noyaux glycaniques et conduit à la formation de polymères linéaires ou ramifiés, homogènes ou mixtes.

### ***La périphérie (fin de synthèse des O-glycannes)***

Les sucres périphériques peuvent substituer soit le squelette, soit directement le noyau. La périphérie comprend le plus souvent des monosaccharides liés selon une anomérie  $\alpha$ , en positions terminales non-réductrices, sur les antennes ou directement sur le noyau. Chez les mammifères, ces monosaccharides consistent généralement en des unités de Gal, Fuc et NeuAc. Chez l'homme, ces sucres périphériques constitueront le support de motifs antigéniques. Le Tableau 1 présente la structure des principaux motifs. L'ajout, entre autre d'acides sialiques et de groupements sulfates sur ces motifs particuliers peut générer une hétérogénéité O-glycanique extrême. L'acide sialique est plus communément lié en  $\alpha$ -2,3 ou  $\alpha$ -2,6 sur un Gal terminal et en  $\alpha$ -2,6 sur le GalNAc du point d'attache. Bien que la majorité des mucines humaines renferment essentiellement de l'acide N-acétylneuraminique (Neu5Ac), des acides 9-O-acétyl-N-acétylneuraminique (Neu5,9Ac<sub>2</sub>) et 7,9-di-O-acétyl-N-acétylneuraminique (Neu5,7,9Ac<sub>3</sub>) ont été mis en évidence dans les mucines du colon humain (Muchmore *et al.*, 1987; Gold & Shochat, 1989). Quant aux groupements sulfates, ils sont présents en positions 3-, 4- ou 6- du galactose et en position 6- de la N-acétylglucosamine. De plus, acide sialique, fucose et groupement sulfate peuvent coexister sur un même O-glycane (Lo-Guidice *et al.*, 1994).

Antigène	Structure	
	Type 1	Type 2
i		Gal β—GlcNAc β—Gal β—GlcNAc β
I		Gal β—GlcNAc β—Gal β—GlcNAc β Gal β—GlcNAc β—Gal β—GlcNAc β
H1/H2	GlcNAc β   Gal β   Fuc α	Gal β—GlcNAc β   Fuc α
Le <sup>a</sup> /Le <sup>x</sup>	Fuc α—GlcNAc β   Gal β	Gal β—GlcNAc β   Fuc α
Le <sup>b</sup> /Le <sup>y</sup>	Fuc α—GlcNAc β   Gal β   Fuc α	Gal β—GlcNAc β   Fuc α Fuc α
A1/A2	GlcNAc β   Gal β   Fuc α   GalNAc α	Gal β—GlcNAc β   Fuc α   GalNAc α
B1/B2	GlcNAc β   Gal β   Fuc α   Gal α	Gal β—GlcNAc β   Fuc α   Gal α
T		GalNAc α-O-Ser/Thr   Gal β
Tn		GalNAc α-O-Ser/Thr
Sialyl-Tn		NeuAc2α   GalNAc α-O-Ser/Thr

**Tableau 1:** Structure des principaux motifs glycaniques d'antigènes tissulaires identifiés chez l'homme. | liaison 1-2; / liaison 1-3; — liaison 1-4; \ liaison 1-6.

## 2.2. La diversité des structures O-glycanniques

Si beaucoup d'informations sont disponibles concernant les structures, les fonctions et le métabolisme des O-glycannes chez les mammifères, la structure des O-glycannes demeure largement inconnue dans le reste du règne animal. A ce jour, les deux seules études systématiques de la structure des O-glycannes chez d'autres espèces concernent la classe des amphibiens par notre laboratoire, et la classe des poissons par l'équipe du Dr Inoue, au Japon. Les quelques études ponctuelles conduites chez les oiseaux (Strecker *et al.*, 1989 ; 1992), chez

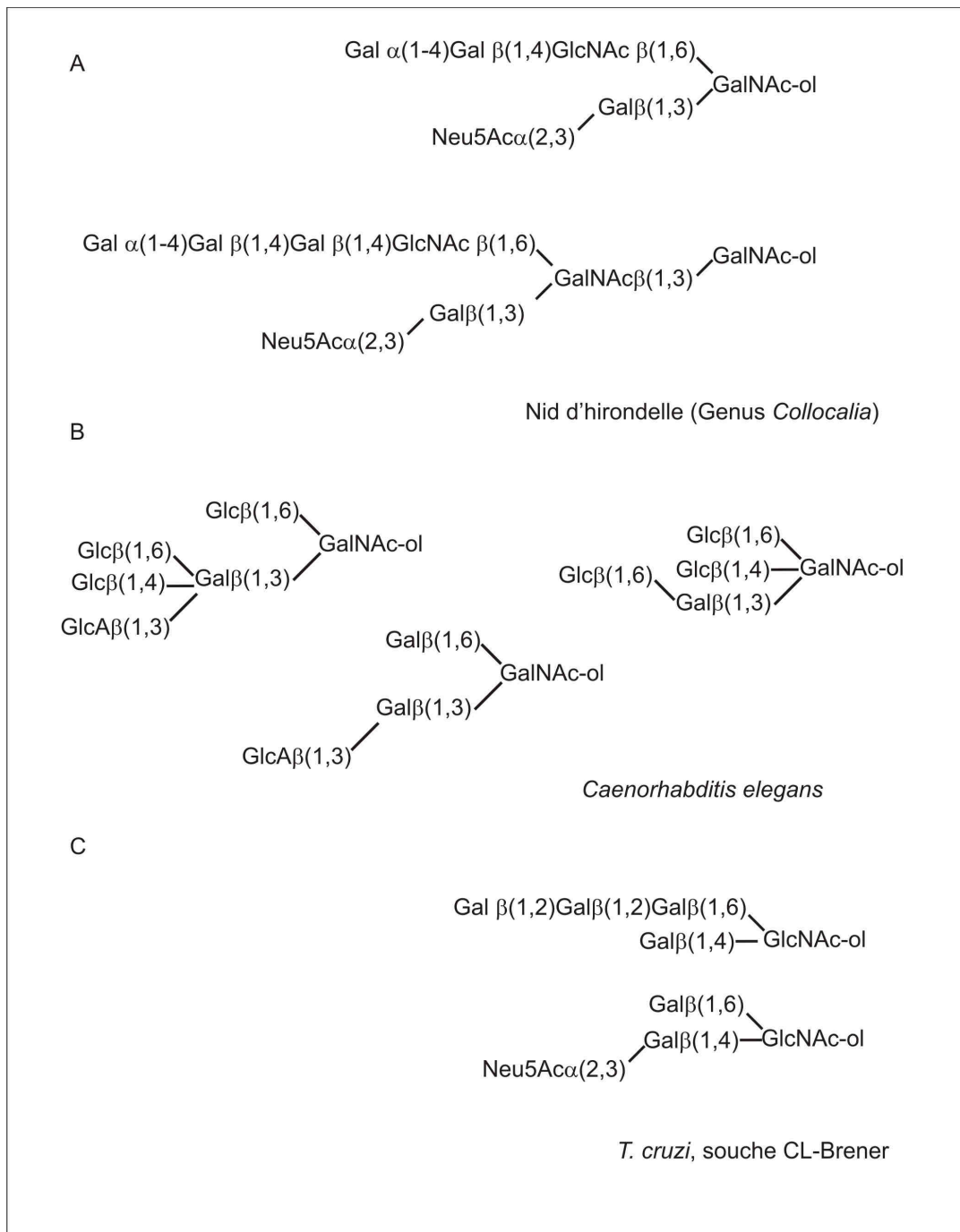


les parasites (Huang *et al.*, 2001 ; Khoo *et al.*, 1991) et chez les invertébrés (Meikle *et al.*, 1987) mettent en évidence l'existence de schémas structuraux très différents de ceux existant chez les mammifères, générant une extraordinaire diversité structurale.

De manière surprenante, la structure du noyau des O-glycannes est remarquablement conservée tout au long de l'évolution, à quelques rares exceptions. A titre d'exemple, tous les O-glycannes des mucines salivaires du martinet d'Asie (genre *Collocalia*) contiennent les noyaux de types 2 ou 5 (Figure 3A) (Wieruszski *et al.*, 1987; Strecker *et al.*, 1992). De même, les O-glycannes isolés des œufs de nombreuses espèces de *Salmonidae* s'articulent autour des noyaux de types 1 et 5, tandis que la grande majorité des O-glycannes d'amphibiens possèdent les noyaux de types 1, 2 et 3.

Toutefois, l'étude des structures O-glycanniques synthétisées par des organismes modèles ou par certains parasites a permis la caractérisation de noyaux originaux. Un noyau de type complètement nouveau, fucosylé, a été décrit dans la mucine sous-maxillaire bovine : Fuc( $\beta$ 1,6)GalNAc (Martinsson *et al.*, 1998). Par ailleurs, les structures O-glycanniques isolées de glycoprotéines de type mucine chez *Caenorhabditis elegans* démontrent la présence inédite de Glc au sein du noyau Glc( $\beta$ 1,6)[Gal( $\beta$ 1,3)GalNAc-ol] ou sur des structures particulières contenant à la fois du Glc( $\beta$ 1,6) et du Glc( $\beta$ 1,3) (Figure 3B) (Guérardel *et al.*, 2001). Un noyau original a été mis en évidence chez le parasite *Trypanosoma cruzi* (Figure 3C) (Previato *et al.*, 1994). Les O-glycannes sont liés à la protéine par une unité de GlcNAc, et ne répondent donc pas précisément à la définition des O-glycannes de type mucine. Néanmoins, leur structure générale, ainsi que leur localisation sur des glycoprotéines hyper-O-glycosylées, suggèrent qu'ils sont les équivalents des O-glycannes de type mucine chez ce parasite.

La variabilité structurale des O-glycannes tient également à l'élongation ultérieure des chaînes glycanniques, qui peut prendre les formes les plus diverses en fonction de l'organisme. Par exemple, les O-glycannes isolés de la mucine salivaire du martinet d'Asie présentent un squelette constitué du disaccharide Gal( $\beta$ 1-4)Gal $\beta$ , inconnu chez l'homme, ainsi que la liaison d'un Gal ( $\alpha$ 1,4), uniquement décrit chez les N- et O-glycannes d'oiseaux et chez le xénope *Xenopus laevis* (Guérardel *et al.*, 2000). La présence de monosaccharides inhabituels peut engendrer une diversité supplémentaire. Chez le nématode *Toxocara canis*, les structures O-glycanniques majeures sont les trisaccharides 2-O-Me-Fuc( $\alpha$ 1-2)4-O-Me-Gal( $\beta$ 1-3)-GalNAc et 2-O-Me-Fuc( $\alpha$ 1-2)Gal( $\beta$ 1-3)GalNAc (Khoo *et al.*, 1991).



**Figure 3:** Exemples de O-glycannes isolés de diverses espèces animales. (A) Glycannes extraits de mucines salivaires du martinet d'Asie (nid d'hirondelle) (Wieruszkeski et al., 1987) (B) Glycannes libérés des glycoprotéines de *C. elegans* (Guérardel et al., 2004) ; (C) Glycannes libérés de glycoprotéines membranaires de *Trypanosoma cruzii* (Todeschini et al., 2001).

La présence de motifs complexes particuliers peut également enrichir la variété structurale des O-glycannes. Les O-glycannes isolés du trématode *Schistosoma mansoni* s'articulent exclusivement autour des noyaux classiques de type 1 et 2, mais portent des motifs Fuc oligomérisés :  $\pm\text{Fuc}(\alpha 1,2)\text{Fuc}(\alpha 1,3)\text{GalNAc}(\alpha 1,4)[\text{Fuc}_{2\text{ou}3}(\alpha 1,3)]\text{GlcNAc}\beta$ - (Khoo *et al.*, 1995; 1997). Finalement, les O-glycannes isolés des polysialoglycoprotéines d'œufs de *Salmonidae* (truite et saumon) sont constitués de corps glycaniques non répétitifs sur lesquels sont greffés des oligo- ou polymères d'acides sialiques (Inoue, S. & Inoue, Y, 1997). Les acides sialiques, exclusivement localisés en position terminale non-réductrice dans les O-glycannes de mammifères, constituent typiquement le domaine majeur des O-glycannes de poisson. De plus, on observe parmi ces acides sialiques de l'acide N-glycolylneuraminique (NeuGc) (Guérardel *et al.*, 2006) et des formes particulières telles que l'acide 2-céto-3-désoxynononique (Kdn) et l'acide 9-O-acétyl-2-céto-3-désoxynononique (Kdn9Ac) (Iwasaki *et al.*, 1990).

La diversité des structures O-glycaniques existantes est parfaitement illustrée par l'étude des O-glycannes isolés des gangues oviductales de diverses espèces d'amphibiens. Cette étude a mené à la caractérisation d'environ 600 structures d'O-glycannes originaux, dont la plupart ont été rassemblées dans une base de données, la Glycobase (<http://glycobase.univ-lille1.fr/base/>). Ces oligosaccharides renferment généralement entre deux et douze monosaccharides, et jusqu'à vingt monosaccharides chez l'anoure *Rana clamitans*. De nombreux déterminants antigéniques trouvés chez l'homme ont été identifiés chez les amphibiens. En particulier, l'antigène tissulaire de groupe H est présent dans les trois espèces d'ambystomes étudiées, tandis que l'antigène tissulaire de groupe A est observé dans plusieurs O-glycannes de l'anoure *Bufo arenarum* (Morelle *et al.*, 1998). De même, les motifs  $\text{Le}^x$ ,  $\text{Le}^y$  et  $\text{Le}^a$  substituent la majorité des O-glycannes isolés de *Pleurodeles Waltl* (Strecker *et al.*, 1992). Malgré la présence de motifs communs, les O-glycannes d'amphibiens diffèrent substantiellement de ceux des mammifères par la présence de nombreux motifs inédits. Au contraire des mammifères, la fucosylation chez les amphibiens n'intervient pas exclusivement en position terminale, mais peut former des motifs oligomérisés tels que  $\text{Fuc}(\alpha 1-2)\text{Fuc}\alpha$  et  $\text{Fuc}(\alpha 1-3)[\text{Fuc}(\alpha 1-2)]\text{Fuc}\alpha$  comme chez *Ambystoma maculatum* (Fontaine *et al.*, 1995). De la même façon, les acides sialiques peuvent être mono- ou disubstitués, entre autres chez *Ambystoma tigrinum* (Maes *et al.*, 1995). De plus, comme chez les poissons, la diversité structurale est encore accrue par l'existence de nombreuses formes d'acides sialiques différentes. Ainsi, chez les ambystomes, le Kdn et le Kdn9Ac ont été détectés dans des

proportions équivalentes, tandis que du Kdn7Ac et du Kdn7,9Ac<sub>2</sub> ont été mis en évidence chez *Pleurodeles waltl* (Klein *et al.*, 1997).

Finalement, au contraire de la débauche structurale des O-glycannes observée chez les poissons et les amphibiens, les insectes semblent posséder une O-glycosylation beaucoup plus simple. Les structures O-glycanniques d'insectes semblent particulièrement peu diversifiées en comparaison avec l'extrême variété des espèces d'insectes existant. En effet, les premières études concernant les insectes suggèrent la seule présence d'O-glycannes très courts, réduits aux antigènes T Gal(β1,3)GalNAc-O-Ser/Thr et Tn GalNAc-O-Ser/Thr.

### 2.3. Spécificité d'espèce des O-glycannes

L'analyse systématique des O-glycannes chez différentes espèces animales a mis en évidence l'extrême variabilité des structures existantes. De plus, les données structurales accumulées chez les poissons et les amphibiens suggèrent que certaines structures O-glycanniques sont strictement spécifiques à chaque espèce. Ceci n'implique évidemment pas que, malgré l'énorme potentiel de variabilité des O-glycannes, chaque espèce présente des structures totalement différentes des autres espèces.

La spécificité d'espèce peut revêtir différents aspects. Chez les saumons, les O-glycannes isolés des polysialoglycoprotéines (PSGP) de nombreuses espèces présentent tous une architecture très similaire. La spécificité d'espèce apparaît alors principalement dans la structure caractéristique des acides sialiques intégrés aux chaînes polysialylées: nature (Neu5Ac, Neu5Gc ou Kdn) ou position des groupements O-acétyl et O-lactyl.

Chez les amphibiens, la variabilité inter-spécifique est plus marquée. Les O-glycannes d'une espèce donnée sont caractérisés soit par la présence de motifs glycaniques inédits, soit par un assemblage particulier de motifs communs à plusieurs espèces. Il est à noter que les O-glycannes d'espèces phylogénétiquement proches partagent souvent plus de points communs que des espèces éloignées. Ainsi, l'étude des O-glycannes de deux espèces de crapauds phylogénétiquement très proches, *Bombina variegata* et *Bombina bombina*, a démontré qu'ils ne se différenciaient que par la nature de leurs acides sialiques terminaux, Kdn ou Neu5Ac. Ceci n'est pas toujours vrai, comme l'a montré l'étude de *Pleurodeles waltl* et *Pleurodeles poireti*, qui présentent des structures glycaniques très différentes malgré leur degré de parenté proche.

La spécificité d'espèce, bien sûr, n'exclut pas qu'une même structure puisse être commune à plusieurs espèces, car certaines activités glycosyltransférasiques sont ubiquitaires

dans le règne animal. Ceci est particulièrement vrai pour les structures les plus courtes, souvent réduites au noyau des O-glycannes. Néanmoins, chaque espèce étudiée possède bien un profil de glycosylation unique.

#### ***2.4 Rôle de la O-glycosylation***

La O-glycosylation est un phénomène post-traductionnel retrouvé dans les organismes à travers tout le règne animal, des insectes aux mammifères supérieurs. Comme précédemment défini, la O-glycosylation concerne particulièrement les glycoprotéines de type mucine. Ces macromolécules de haute masse moléculaire sont organisées en unités de répétition et abondamment O-glycosylées. C'est l'importance de cette glycosylation qui conférerait aux mucines la plupart de leurs propriétés mécaniques et biologiques.

La fonction primordiale des mucines sécrétées est liée à leur forte viscosité qui leur permet d'assurer une protection des épithéliums qu'ils recouvrent à l'égard de multiples agressions mécaniques, physico-chimiques ou microbiennes. En effet, le mucus et les mucines qui le composent piègent de manière non spécifique toute particule indésirable. Ils sont ainsi essentiels au bon fonctionnement du système muco-ciliaire bronchique (Roussel & Lamblin, 1996).

Les mucines peuvent également intervenir dans des phénomènes de reconnaissance spécifiques des micro-organismes, pathogènes ou non. Ces interactions s'établissent en majorité *via* une reconnaissance entre des lectines bactériennes ou virales et des motifs glycaniques précis portés par les mucines. Le cas le plus étudié d'interaction mucine/pathogène concerne la mucoviscidose. Cette pathologie est liée à une mutation d'un canal aux ions chlorure de la membrane apicale des épithéliums sécréteurs, entraînant un important déséquilibre hydrique au sein du mucus bronchique. Celui-ci devenant trop visqueux, le système muco-ciliaire est incapable d'éliminer correctement le mucus qui s'accumule dans les bronches (Roussel et Lamblin, 1996). Le mucus stagnant devient un foyer de propagation de bactéries pathogènes qui ne sont pas éliminées. La principale cause de mortalité chez les patients est le fait d'infections récurrentes par *Pseudomonas aeruginosa*. De plus, il a récemment été mis en évidence qu'une inflammation chronique des cellules trachéo-bronchiales modifie la glycosylation des mucines qu'elles sécrètent, entraînant une surexpression des motifs Sialyl Le<sup>X</sup> et sulfo Le<sup>X</sup> (Groux-Degroote *et al.*, 2007). On peut supposer que chez des patients atteints de la mucoviscidose, la surexpression de ces motifs particuliers, excellents récepteurs pour *P. aeruginosa*, faciliterait la fixation de cette bactérie.

Finalement, l'altération de la glycosylation des mucines est souvent associée à des pathologies sérieuses telles que la maladie de Crohn (Robbe *et al.*, 2004) et certains cancers (Brockhausen, 1999). Ces motifs particuliers sont considérés comme des marqueurs de tumorigénèse. A ce propos, la modification des O-glycannes se manifeste par une diminution de la longueur des chaînes, se traduisant par l'apparition des motifs T et Tn (Springer *et al.*, 1985) ou par une augmentation de la sialylation (Julien *et al.*, 2006 ; Teinturier-Lelièvre *et al.*, 2005).

Des études effectuées sur l'organisme modèle *Drosophila melanogaster* ont par ailleurs établi que les O-glycannes de type mucine jouent un rôle essentiel dans le développement. En effet, si chez cet insecte les structures O-glycanniques sont restreintes aux antigènes T et Tn, une mutation dans la région codante d'un gène d'une polypeptide GalNAc Transférase spécifique entraîne un phénotype récessif létal lors du développement embryonnaire (Ten Hagen et Tran, 2002 ; Schwientek *et al.*, 2002).

*L'appréhension des structures O-glycanniques permet d'explorer la diversité des structures existantes à travers les espèces, de caractériser certaines activités glycosyltransférasiques ancestrales, conservées au cours de l'évolution ou au contraire, ayant disparu chez les mammifères. Les relations existant entre structure et fonction des O-glycannes, en particulier liées à des pathologies, ou à une pathogénéicité particulière de certains parasites peuvent être liées à la présence de structures particulières que seule une analyse structurale fine permettra de mettre en évidence.*

## II - Premiers travaux : Les potentiels de O-glycosylation de la guêpe commune *Vespula germanica* et du frelon *Vespa crabro*.

### 1. Introduction

Les structures O-glycanniques d'insectes semblent particulièrement peu diversifiées en comparaison avec l'extrême variété décrite chez les mammifères, les amphibiens ou les poissons. En effet, les premières études concernant les insectes suggéraient la seule présence d'O-glycannes courts, très simples. Ainsi, les protéines recombinantes produites chez *Spodoptera frugiperda* sont substituées par les seules structures Gal( $\beta$ 1-3)GalNAc et GalNAc- $\alpha$ -Ser/Thr, sans squelette ni sucre périphérique (Thomsen *et al.*, 1990), en accord avec l'étude des structures O-glycanniques de *Drosophila melanogaster* (Seppo et Tiemeyer, 2000). Par ailleurs, l'étude du potentiel de O-glycosylation sur trois lignées cellulaires de Lépidoptères vérifie l'expression ubiquitaire de la polypeptide UDP-GalNAc transférase à l'origine de la structure GalNAc-O-Ser/Thr, ainsi que de l'UDP-Gal core 1 ( $\beta$ 1,3) galactosyltransférase (Lopez *et al.*, 1999), mais aussi la présence des antigènes T et Tn par reconnaissance lectinique.

Ainsi, il existe ainsi un réel contraste entre le nombre d'espèces d'insectes et la variété des structures O-glycanniques décrites chez ces organismes. Ce contraste est particulièrement étonnant, d'autant plus que les structures N-glycanniques semblent présenter une variabilité assez importante (Partie B, Figure 4).

Le développement du système d'expression recombinant baculovirus/cellules d'insectes a stimulé l'exploration des processus de glycosylation de différentes espèces d'insectes. En particulier, si les glycosyltransférases responsables de la biosynthèse des antigènes T et Tn sont ubiquitaires, une étude effectuée chez *Mamestra brassicae* suggère une activité glycosyltransférasique supplémentaire Gal( $\alpha$ 1-4) [Gal( $\beta$ 1-3) GalNAc- $\alpha$ ] transférase (Lopez *et al.*, 1998). L'existence de cette activité supplémentaire suggère que chez certaines espèces, la capacité de O-glycosylation n'est pas restreinte aux seules structures Gal( $\beta$ 1-3)GalNAc et GalNAc- $\alpha$ -Ser/Thr.

Aussi, intrigués par l'étonnante pauvreté des structures décrites chez les insectes en contraste avec l'extrême diversité des structures O-glycanniques rencontrées chez d'autres organismes, nous avons décidé d'explorer davantage le processus de O-glycosylation chez deux espèces d'insectes afin de vérifier si, en marge des structures majoritaires décrites, il n'existerait pas des structures minoritaires, plus complexes. Pour ce faire, nous avons exploité

une source permettant la purification d'une importante quantité de mucines salivaires : les nids de guêpe (*Vespula germanica*) et de frelon (*Vespa crabro*). En effet, la guêpe et le frelon sont tous deux des guêpes sociales appartenant à l'ordre des Hyménoptères. Elles construisent des nids fait d'une pâte de fibres végétales triturées avec de la salive et déposée en bandes régulières (Villemant, 2005).



**Figure 4 :** *Frelons (Vespa crabro)* sur leur nid (source : Dr G. Strecker).

Une telle stratégie nous a permis de décrire des O-glycannes libérés de mucines salivaires de guêpe contenant de la phosphoéthanolamine (Maes *et al.*, 2005). Des analyses supplémentaires effectuées suite à ces travaux nous ont permis de mettre en évidence, en marge des structures majoritaires précédemment décrites, l'existence de structures minoritaires, complexes, résultats d'activités glycosyltransférisiques variées.

## 2. Résultats

Si elle est restreinte, la capacité de O-glycosylation semble dépendante du système cellulaire étudié et de façon plus intéressante, non limitée aux structures précédemment décrites. En effet, nos premiers travaux, résumés dans l'article suivant, publié en 2005 dans Carbohydrate research, indiquent que les antigènes T et Tn peuvent être substitués par un groupement de phosphoéthanolamine chez la guêpe *Vespula germanica*.



La présence de phosphoéthanolamine avait déjà été reportée auparavant sur des N-glycannes isolés du criquet migrateur africain *Locusta migratoria* (Hård *et al.*, 1993) ainsi que sur les glycolipides de la drosophile (Kramerov *et al.*, 1996) et de la mouche nécrophage *Calliphora vicina* (Helling *et al.*, 1991). Cependant, elle n'avait jamais été décrite sur des O-glycannes.

La suite de ces travaux, portant à la fois sur les potentiels de O-glycosylation de la guêpe et du frelon, est résumée sous la forme d'un manuscrit intitulé : *Structural characterization of complex O-linked glycans from insect saliva*.

## Major O-glycans from the nest of *Vespula germanica* contain phospho-ethanolamine

Emmanuel Maes,<sup>a</sup> Estelle Garénaux,<sup>a</sup> Gérard Strecker,<sup>a</sup> Yves Leroy,<sup>a</sup>  
Jean-Michel Wieruszkeski,<sup>b</sup> Colette Brassart<sup>a</sup> and Yann Guérardel<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, CNRS UMR 8576, Université des Sciences et Technologies de Lille, F-59655 Villeneuve d'Ascq, France

<sup>b</sup>UMR 8525 CNRS, Université de Lille II-Institut de Biologie de Lille et Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Professeur Calmette, BP447, F-59021 Lille, France

Received 18 January 2005; received in revised form 26 May 2005; accepted 26 May 2005  
Available online 17 June 2005

**Abstract**—We describe here the structural deciphering of four wasp O-glycans. Following purification of a mixture of glycoproteins from nests of the common wasp *Vespula germanica* L. (Hymenoptera), their substituting O-glycans were liberated by reducing  $\beta$ -elimination and characterised using a combination of high resolution NMR and mass spectrometry analyses. Besides ubiquitously found in the insect cells GalNAc-ol and Gal( $\beta$ 1–3)GalNAc-ol compounds, two novel O-glycans carrying a 2-aminoethyl phosphate group were described for the first time here. We suggest that they present the following structures: **Etn-P-(O→6)-GalNAc-ol** and **Etn-P-(O→6)-[Gal( $\beta$ 1–3)]GalNAc-ol**. In conjunction with previous studies, these results suggest that a 2-aminoethyl phosphate group may act as an alternative to sialic acid for conferring charges to glycoproteins.

© 2005 Published by Elsevier Ltd.

**Keywords:** Insect; O-Glycan; Phosphoethanolamine (PEtn); NMR

### 1. Introduction

Although mammal O-glycans have been extensively studied, little information is available on the structure of these compounds in other phyla. Punctual studies in parasites,<sup>1,2</sup> birds<sup>3</sup> or invertebrates<sup>4</sup> demonstrated a wide variety of organisations that generate a staggering structural diversity within this class of compounds. So far, large scale systematic studies on the structure of O-glycans outside phylum of mammals have only been undertaken in amphibians [[glycobase.univ-lille1.fr](http://glycobase.univ-lille1.fr)] and in fishes,<sup>5</sup> which permitted to identify several hundreds different compounds. This heterogeneity is essentially localised in the non-reducing end of O-glycans, whereas their core structures are remarkably conserved through-

out evolution. On top of a marked inter-species variability, it is noteworthy, that a single species or even a single tissue may synthesise a large number of different O-glycans. For example, in humans, it is estimated to several hundreds in the tracheo-bronchial mucus isolated from a single individual,<sup>6</sup> whereas up to 58 different O-glycans have been characterised from oviducal mucus of the amphibian species *Triturus alpestris* [D. Florea et al., unpublished data].

Compared with the wide heterogeneity observed in most animals, insects seem to synthesise a surprisingly low number of very simple O-glycans. So far, studies conducted on several lepidoptera cell lines suggested that the O-glycosylation in insects was restricted to GalNAc- $\alpha$ -Ser/Thr and Gal $\beta$ 1–3GalNAc- $\alpha$ -Ser/Thr.<sup>7–9</sup> Furthermore, no charged residues have ever been observed on insect O-glycans, whereas these compounds are usually abundantly substituted by either sialic residues or by sulfate groups. Charged glycoconjugates have

\* Corresponding author. Tel.: +33 3 20 33 63 47; fax: +33 3 20 43 65 55; e-mail: [yann.guerardel@univ-lille1.fr](mailto:yann.guerardel@univ-lille1.fr)

previously been observed in insect, but to our knowledge, no sialic acid has ever been observed associated to any glycoconjugate, glycolipid or glycoprotein. In particular, a family acidic and zwitterionic glycolipids substituted by glucuronyl and phospho-ethanolamine has been described in a species of synanthropic fly (*Calliphora vicina*).<sup>10–11</sup> Similarly, charged phosphono-ethanolamine substituted N-glycans were observed in the locust *Locusta migratoria*.<sup>12</sup> These results suggested that the presence of phosphated substituents may be a common feature in insect glycans and a possible alternative to sialic acid to confer a charge to glycoconjugates. In order to investigate the possible occurrence of charged O-glycans in insects, as starting material we used common wasp's nest (*Vespula germanica*), which is mainly made from wasp saliva [[www.inra.fr/Internet/Produits/HYPPZ/RAVAGEUR/6vesger.htm](http://www.inra.fr/Internet/Produits/HYPPZ/RAVAGEUR/6vesger.htm)] and thus highly enriched in insect glycoproteins. Such strategy has already been successfully applied to swallow's nests, which were shown to be associated with salivary mucin-type glycoproteins substituted by unusual O-glycans.<sup>3,13,14</sup> Along ubiquitous GalNAc- $\alpha$ -Ser/Thr and Gal $\beta$ 1-3GalNAc- $\alpha$ -Ser/Thr compounds, the present work establishes for the first time the existence of charged insect O-glycans substituted by a phospho-ethanolamine group.

## 2. Material and methods

### 2.1. Material

Wasp's nests were collected by the fire brigade of Ville-neuve d'Ascq. The nest material and wasps were manually sorted out and dried at 100 °C for 48 h. The wasp's nests were mixed until obtaining a powder and finally suspended (48 h at 4 °C) in phosphate buffered saline (50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 150 mM KCl at pH 7) containing 0.8%  $\beta$ -mercaptoethanol. The extract was centrifuged at 6000 rpm and the supernatant repetitively dialysed against large volumes of water during 72 h at 4 °C.

### 2.2. Purification of glycoprotein material

The dialysed material was fractionated on a Sepharose 6B column (100  $\times$  4 cm) equilibrated and eluted with 100 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0). Fractions were tested for carbohydrates by orcinol reagent and positive fractions were pooled, dialysed against water and lyophilised, yielding 25 g of material was obtained starting from 200 g of wasp's nest powder.

### 2.3. Amino acids and sugar analysis

The amino acid composition analysis was performed as previously described<sup>15</sup> and the amino acids were analysed by HPLC (Spectra physics 8100) in reverse phase

with water PicoTag<sup>®</sup> (3.9  $\times$  150 mm) column. Elution was performed using a binary gradient of sodium acetate, 0.1 M of triethylamine and acetonitrile, the flow rate was 1 mL/min during 17 min at 45 °C.

The monosaccharide composition analysis was performed according to Zanetta et al.,<sup>16</sup> after acid-catalysed methanolysis and analysis of the liberated O-methyl-glycosides as heptafluorobutyrate derivatives. In order to achieve the complete cleavage of the GalNAc-6-phosphate bond, the double methanolysis/acylation procedure was applied.<sup>17</sup> The volatile derivatives were separated by gas chromatography on a Carlo Erba GC 8000 chromatograph equipped with a 25 m  $\times$  0.25 mm CP-Sil5 CB Low bleed/MS capillary column, 0.25  $\mu$ m film phase (Chrompack France, Les Ullis, France) coupled to a Finigan Automass II mass spectrometer.

### 2.4. Isolation of oligosaccharide-alditols

The purified material (about 1 g) was submitted to reductive  $\beta$ -elimination for 72 h at 37 °C in 100 mM NaOH containing 1 M NaBH<sub>4</sub>. The reaction was stopped by the addition of DOWEX 50  $\times$  8 (25–50 mesh, H<sup>+</sup> form) at 4 °C until pH 6.5. After filtration on glass wool and evaporation to dryness, boric acid was eliminated by repetitive distillation as its methyl ester in the presence of methanol. The material was submitted to a cationic exchange chromatography on DOWEX 50  $\times$  2 (200–400 mesh, H<sup>+</sup> form) to remove residual peptides. The fractions containing sugars were purified on Bio-Gel P2 column (Bio-Rad), (150  $\times$  2.5 cm). Finally,

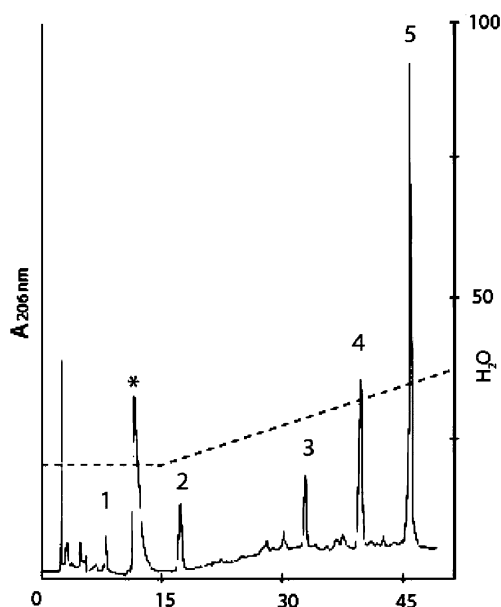


Figure 1. HPLC separation of released oligosaccharide-alditols on a primary amine-bounded silica column. \*, non-carbohydrate material.

oligosaccharide–alditols were fractionated on DOWEX 1 × 2 column (mesh 200–400, HCOO<sup>−</sup> form). Oligosaccharide–alditols were desorbed with water and pH was adjusted to 7 with sodium hydroxide.

### 2.5. Separation of oligosaccharide–alditols

Compounds eluted with water were purified by HPLC (Fig. 1) on a primary amine-bounded silica column (Supelcosyl™, LC-NH<sub>2</sub>, 4.6 mm × 250 mm, Supelco Inc., Bellefonte, PA, USA) using a gradient of MeCN–water and flow rate of 1 mL/min. Oligosaccharide–alditols were detected by UV spectroscopy at 206 nm.

### 2.6. NMR analysis

NMR spectra were acquired on a Bruker ASX 400 NB spectrometer equipped with double resonance (<sup>1</sup>H/X) broadband inverse *z*-gradient probe head (<sup>1</sup>H at 400.33 MHz and <sup>31</sup>P at 162.06 MHz). Before analysis, samples were treated twice with <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O (99.97% <sup>2</sup>H atoms, Euriso-top, CEA, Saclay, France) and then dissolved in 250 μL of <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O in Shigemi® tubes (Shigemi

Inc., Alison Park, United States). <sup>1</sup>H chemical shifts ( $\delta$ ) were expressed in parts per million (ppm) related to the methyl signal of acetone as internal standard ( $\delta_{\text{H}}$  2.225). <sup>31</sup>P chemical shift has been determined with 10% (v/v) phosphoric acid in D<sub>2</sub>O as external standard ( $\delta_{\text{P}}$  0.0). All delays and pulses were performed for each one- and two-dimensional experiments. 2D experiments were carried out using standard Bruker pulse program.

### 2.7. Mass spectrometry analysis

Samples were reconstituted in water and analysed by mass spectrometry on a LCQ DK XP+ ion trap (Thermo Finnigan) instrument. Samples were mixed with an equal volume of MeOH–0.1 M aqueous formic acid and infused directly at 50 nL/min using the nanoflow probe option for MS and MS<sup>n</sup> analyses.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Nature of the material

The reduced material was analysed for amino acids and carbohydrates before chromatographic separation, as described in material and methods section. A carbohydrate to protein ratio of 1 to 1 was calculated, which established the presence of large quantities of glycoproteins within this material. As shown in Table 1, simultaneous presence of large quantities of GalNAc, GlcNAc, Gal and Man residues is indicative of the presence of both N- and O-glycans. In conjunction with high content of O-glycans, the prevalence of four amino acids Ser, Thr, Gly and Pro, which accounted for more than 36% of the crude material total amino acids, suggested

**Table 1.** Amino acid and carbohydrate compositions of total material (number of residues per 100)

Amino acids				Monosaccharides	
Arg	4.3	Leu	6.8	Xyl	2.9
Lys	5.6	Met	0.8	Rha	4.1
Ala	8.6	His	2.9	Fuc	4.0
Thr	7.3	Phe	3.8	Glc	18.2
Gly	10.1	Glu	9.4	Gal	37.3
Val	5.2	Asp	9.5	Man	17.4
Ser	10.2	Cys	0.5	GlcNAc	7.7
Pro	9.2	Tyr	1.6	GalNAc	8.4
Ileu	4.2			NeuAc/Gc	0

**Table 2.** <sup>1</sup>H NMR chemical shifts of reduced O-glycans

Residues	Protons	Oligosaccharide–alditols				
		GalNAc-ol <b>1</b>	Gal(β1–3)GalNAc-ol <b>2</b>	PEtn(6)Hexen-ol <b>3</b>	PEtn(6)GalNAc-ol <b>4</b>	Gal(β1–3)[PEtn(6)]GalNAc-ol <b>5</b>
GalNAc-ol/Hexen-ol	H-1/H-1'	3.741/3.678	n.d.	3.619/3.526	3.741/3.681	3.797/3.744
	H-2	4.251	4.395	4.259	4.263	4.403
	H-3	3.849	4.064	5.835	3.870	4.088
	H-4	3.389	3.507	5.835	3.439	3.561
	H-5	3.927	4.195	4.409	4.087	4.356
	H-6/H-6'	3.668/3.647	3.69/3.63	3.920/3.799	3.942	3.94
	NAc	2.055	2.050	—	2.058	2.053
Gal	H-1	—	4.478	—	—	4.480
	H-2	—	n.d.	—	—	3.562
	H-3	—	n.d.	—	—	3.677
	H-4	—	3.901	—	—	3.896
	H-5	—	n.d.	—	—	3.727
PEtn	CH <sub>2</sub> N	—	—	3.274	3.274	3.274
	CH <sub>2</sub> OP	—	—	4.108	4.108	4.108

PEtn: Phosphoethanolamine; Hexen-ol: 3-hexene-1,2,5,6-tetrol.

the presence of mucin-type glycoproteins in the material, as previously described for swallow's nests.<sup>14</sup> On the other hand, small amounts of rhamnose and xylose are indicative of the presence of contaminating vegetal material in the mixture, as expected considering its nature. In order to enrich the starting material in glycoproteins, it was further purified by size exclusion chromatography on a Sepharose 6B column. Carbohydrate containing fractions were then collected for glycan analyses. It is noteworthy that no trace of any type of sialic acid was ever detected at any stage of the purification from crude material to purified O-glycans. In the present work, we concentrated in the deciphering of eventual mucin type O-linked glycans as suggested by composition analyses.

### 3.2. Isolation and NMR studies of oligosaccharide-alditols

Purified material was submitted to alkaline borohydride degradation and the released reduced oligosaccharides fractionated by HPLC on an amino-bonded column eluted with a gradient of water/acetonitrine. As shown in Figure 1, five peaks labelled 1–5 were individually collected and systematically analysed by 400-MHz <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. Chemical shifts of the protons of individual constituents obtained from sequential <sup>1</sup>H and <sup>31</sup>P NMR experiments have been compiled in Table 2. Complete NMR analyses revealed that compounds 1 and 2 are simple O-glycans ubiquitously found in insects while compounds 4 and 5 are novel 2-aminoethyl-phosphate group substituted O-glycans. Then, compound 3 was assigned as a degradation product of both compounds 4 and 5.

<sup>1</sup>H NMR signals of compound 1 were attributed owing to <sup>1</sup>H–<sup>1</sup>H COSY and TOCSY experiments. Their chemical shifts perfectly matched with those of GalNAc-ol unit, as previously described in the literature.<sup>18</sup> In particular, it was unambiguously characterised by its H-2, H-5 and NAc signals at 4.251, 3.927 and 2.055 ppm, respectively. Peak 2 was an extension of previous compound with a 3-O-linked β-Gal unit, as shown by the strong downfield shift of the H-2 and H-5 signal of GalNAc-ol and the observation of the β-anomeric proton at δ 4.478 ppm (<sup>3</sup>J<sub>1,2</sub> = 7.4 Hz).<sup>18,19</sup> Therefore, compound 2 corresponded to the Gal(β1–3)GalNAc-ol disaccharide. These data are in agreement with previous studies on the structure of insect O-linked glycans that showed the existence of these two components in lepidoptera cells.<sup>8</sup>

As for two previous compounds, 2D-relayed COSY spectrum of compounds 4 (Fig. 2A) showed a spin system attributed to a terminal GalNAc-ol unit. However, H-5 and H-6,6' signals of this unit showed significant downfield shifts (Δδ +0.16 and +0.28 ppm, respectively) compared with compound 1 (Table 2), which were

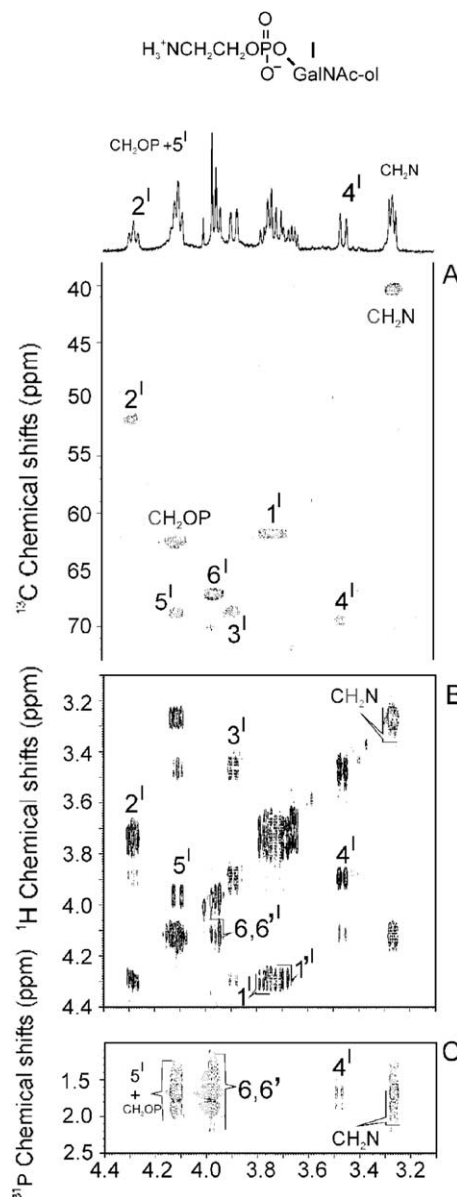


Figure 2. NMR spectra of oligosaccharide-alditol 4. (A) <sup>1</sup>H–<sup>13</sup>C HMQC spectrum; (B) <sup>1</sup>H–<sup>1</sup>H COSY spectrum; (C) <sup>1</sup>H–<sup>31</sup>P HMQC–TOCSY spectrum with 120 ms as mixing time.

tentatively attributed as the consequence of a substitution in C-6 position. The <sup>1</sup>H NMR spectrum showed two unknown additional signals at δ 3.274 and 4.108 ppm that, respectively, correlated with carbon signals at δ 40.61 and 62.64 ppm on a heteronuclear <sup>1</sup>H–<sup>13</sup>C HMQC spectrum (Fig. 2A). On <sup>1</sup>H–<sup>1</sup>H COSY spectrum (Fig. 2B), both signals showed a clear <sup>3</sup>J correlation cross-peak that established the vicinal position of the two corresponding carbons. These NMR parameters matched with those previously observed for CH<sub>2</sub> groups of phospho-ethanolamine (PEtn) present in various polysaccharides<sup>20</sup> and suggested the presence of such substituent in C-6 position of GalNAc-ol residue. On these bases, signals at δ 3.247 and 4.108 ppm were

assigned as CH<sub>2</sub>N and CH<sub>2</sub>OP protons, respectively. In agreement with CH<sub>2</sub>OP attribution, the multiplet at  $\delta$  4.108 showed a supernumerary coupling (about 7 Hz) resulting from the vicinal coupling constant  $^3J_{\text{H,P}}$ .  $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$  HMQC experiment confirmed the presence of a phosphorus atom owing to the observation of an intense signal at  $\delta$  1.709 ppm (data not shown). It also permitted to directly correlate phosphorus atom through  $^3J_{\text{H,P}}$  correlation to H-6, H-6' of GalNAc-ol at  $\delta$  3.942 ppm on one side and to CH<sub>2</sub>OP proton signals  $\delta$  4.108 ppm on the other side. Furthermore, a very low intensity signal was observed at  $\delta$  3.274 ppm and attributed to a  $^4J_{\text{H,P}}$  correlation with CH<sub>2</sub>N protons. In agreement,  $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$  HMQC-TOCSY experiment extended  $^3J_{\text{H,P}}$  correlations to CH<sub>2</sub>N proton signals at  $\delta$  3.274 ppm and to H-5 and H-4 of GalNAc-ol residue (Fig. 2C). Taken together, NMR data clearly established the structure of compounds **4** as [H<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O(HPO<sub>3</sub>)](6)GalNAc-ol. Then, MALDI-TOF analysis in positive mode of compound **4** showed

three major peaks at  $m/z$  368.9, 384.9 and 390.9 (data not shown), which were assigned to [M+Na]<sup>+</sup>, [M+K]<sup>+</sup> and [M+2Na-H]<sup>+</sup> adduct ions of [H<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O(HPO<sub>3</sub>)](6)GalNAc-ol, in agreement with previous NMR analyses.

As observed on 2D-relayed COSY spectrum (Fig. 3), compounds **5** showed two complete spin systems assigned to a  $\beta$ -Gal residue and to a GalNAc-ol unit. Their proton chemical shifts were very similar to those observed for compound **2** and are in agreement with the presence of Gal( $\beta$ 1-3)GalNAc-ol disaccharide, except for the H-5 and H-6,6' downfield shifts of GalNAc-ol unit at  $\delta$  4.356 and 3.94 ppm. As for compound **4**, the presence of a PEtn group was established by the two previously assigned correlated CH<sub>2</sub>N signal at  $\delta$  3.274 ppm and CH<sub>2</sub>OP signal at  $\delta$  4.108 ppm H-5 and H-6,6' downfield shifts of GalNAc-ol unit permitted to position the PEtn group on the C-6 of GalNAc-ol unit. These data established the structure of compound **5** as Gal( $\beta$ 1-3)[H<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O(HPO<sub>3</sub>)]-6-GalNAc-ol.

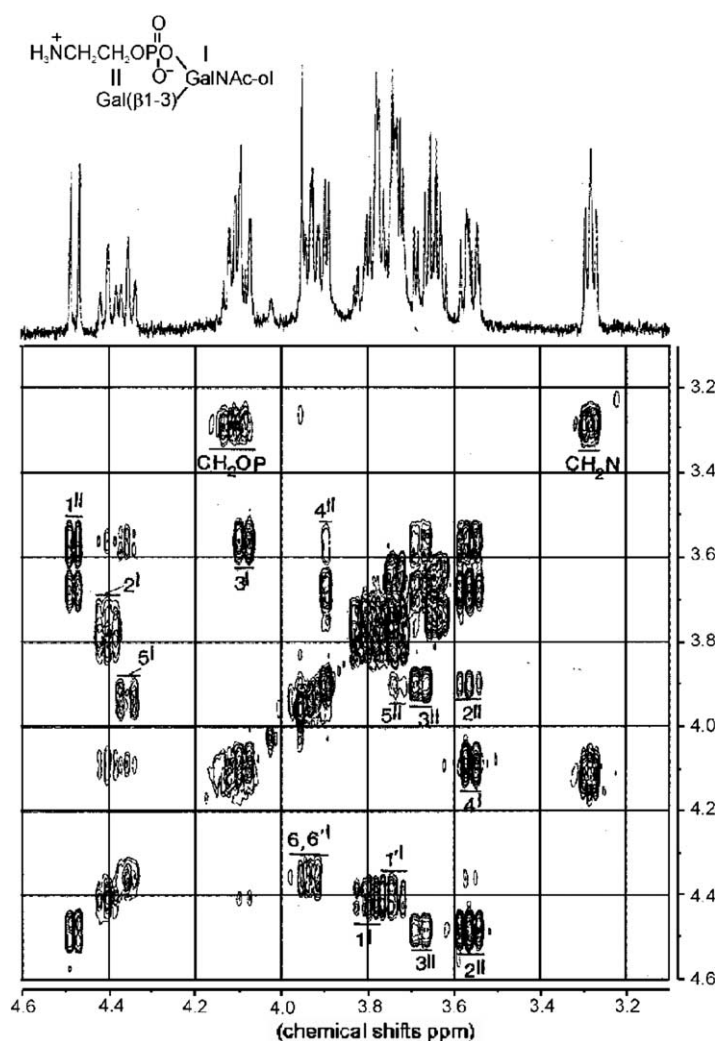
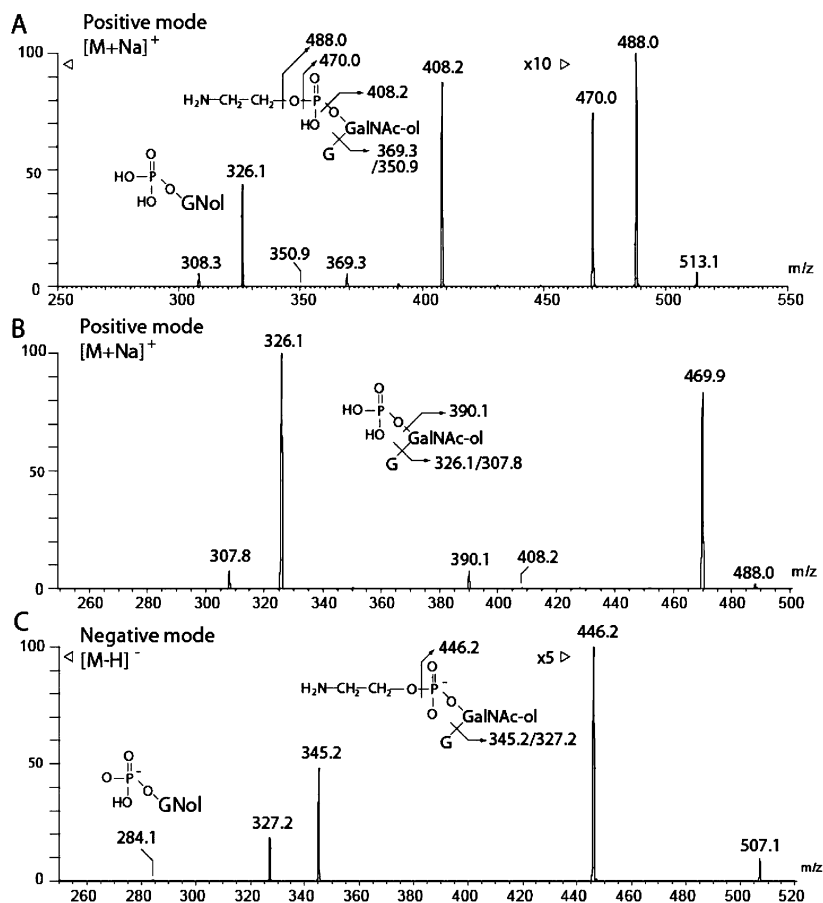


Figure 3. Detail of one-relayed  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY spectrum of compound **5** (F1: 4.6–3.1, F2: 4.6–3.1 ppm).

Attribution of this compound was confirmed by multiple CID-MS/MS experiments. ESI-MS analysis in positive mode showed an ion at  $m/z$  531.1 that was assigned to the  $[M+Na]^+$  adduct of compound **5**. Its fragmentation pattern confirmed the presence of a Gal-GalNAc-ol motif, owing to the presence of a fragment ion at  $m/z$  408.2 (Fig. 4A). Loss of a Gal residue from pseudo-molecular ion generated a B- and C-type pair of fragment ions at  $m/z$  369.3 and 350.9, respectively, which established that Gal residue is in terminal non-reducing position of the molecule and that phospho-ethanolamine group directly substitutes GalNAc-ol residue. This last point was confirmed by the observation of secondary fragment ions at  $m/z$  326.1 and 308.3 attributed to  $HPO_3$ -GalNAc-ol motif that resulted from simultaneous cleavages of phosphatidyl bond between  $H_2N-(CH_2)_2$  and phosphate group and Gal-GalNAc-ol glycosidic bond. MS<sup>3</sup> analysis from the primary fragment at  $m/z$  488 that resulted from loss of  $H_2N-(CH_2)_2$  group also generated the  $HPO_3$ -GalNAc-ol motif at  $m/z$  307.8 and 326.1 (Fig. 4B). Similar analysis realised in negative mode permitted to fragment  $[M-H]^-$  adduct of this compound. In accordance with previous data, fragmentation spectrum showed both

selective losses of terminal Gal or ethanolamine substituents at  $m/z$  327.2/345.2 and 446.2, respectively, and their simultaneous losses to generate phosphorylated GalNAc-ol motif at  $m/z$  284.1 (Fig. 4C). Taken together, these data unambiguously confirmed the sequence of compound **5** as previously deduced by NMR analysis.

MALDI-TOF analysis of compound **3** showed three major peaks at  $m/z$  293.9, 319.8 and 315.9 (data not shown), tentatively assigned to a 2-aminoethyl phosphate group linked to a  $C_6O_3H_{11}$  aglycone. Complete assignment of protons through a COSY experiment permitted to identify the aglycon to a 3-hexene-1,2,5,6-tetrol in accordance with previously published parameters.<sup>21</sup> The presence of  $CH_2N$  and  $CH_2OP$  proton signals at  $\delta$  3.274 and 4.108 ppm, respectively, confirmed the presence of a 2-aminoethyl phosphate group, as in compounds **4** and **5**. Then, deshielding of H-6,6' of hexane-tetrol residue at  $\delta$  3.920/3.799 ppm compared to H-1,1' parameters at  $\delta$  3.619/3.526 ppm established that 3-hexene-1,2,5,6-tetrol is substituted in C-6 position by the 2-aminoethyl phosphate group. Hexene-tetrol containing components are commonly found in reductive elimination products and are thought to originate from a peeling reaction of *O*-linked glycans, releasing C-6



**Figure 4.** ESI-MS<sup>n</sup> fragmentation patterns of compound **5**. (A) MS<sup>2</sup> fragmentation of  $[M+Na]^+$  adduct at  $m/z$  531.1 in positive mode. (B) MS<sup>2</sup> fragmentation of fragment at  $m/z$  488.0 in positive mode and (C) MS<sup>2</sup> fragmentation of  $[M-H]^-$  adduct at  $m/z$  507.1 in negative mode.

upper branch from C-3 lower branch.<sup>21,22</sup> In this respect, compound **3** appears as a degradation product of both compounds **4** and **5**, which retrospectively confirms the position of 2-aminoethyl phosphate group on C-6 of GalNAc-ol residue.

The four major glycans extracted from wasp nest exhibit typical features of animal mucin-type O-glycans, which strongly suggest that they originate from wasp derived material and not from residues of entrapped vegetal material. Indeed, the hypothesis of a possible vegetal origin for these compounds is most unlikely considering that mucin type O-glycans have, to our knowledge, never been observed in plants, despite much effort done over the last years to uncover such compounds [Dr. P. Lerouge, personal communication]. Observation of GalNAc and Gal(β1–3)GalNAc cores in these components is in total agreement with previous studies realised on insect O-glycosylation. The phospho-ethanolamine containing components described here represent the first known example of insect charged O-glycans and are so far unique in animal kingdom. Although presenting zwitterionic properties, PEtn may act as an unexpected substitute for acidic groups to confer charge to O-glycosylated glycoproteins in insects. Considering that phospho-ethanolamine and phosphono-ethanolamine based glycoconjugates have been previously described in two other insect species, whereas neither sialic acid nor sulfate based ones have been, we may envisage the possibility of a distinct structural evolution of insect glycosylation processes. Systematic studies of insect glycoconjugates structures as well as their genetic counterparts are needed to confirm this appealing hypothesis.

#### Acknowledgements

We thank Prof. P. Lerouge (UMR 6037 CNRS, IFRMP 23, Université de Rouen) for helpful discussion and are grateful to firemen from fire department of Villeneuve d'Ascq for providing wasp nests.

#### References

1. Jones, C.; Todeschini, A. R.; Agrellos, O. A.; Previato, J. O.; Mendonca-Previato, L. *Biochemistry* **2004**, *43*, 11889–11897.

2. Huang, H. H.; Tsai, P. L.; Khoo, K. H. *Glycobiology* **2001**, *11*, 395–406.
3. Strecker, G.; Wieruszkeski, J. M.; Cuvillier, O.; Michalski, J. C.; Montreuil, J. *Biochimie* **1992**, *74*, 39–51.
4. Meikle, P.; Richards, G. N.; Yellowlees, D. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 16941–16947.
5. Inoue, S.; Inoue, Y. In *Glycoproteins II: New comprehensive biochemistry*; Neuberger, A., van Deenen, L. L. M., Eds. 1997; Elsevier; Vol. 29b, pp 243–402.
6. Lamblin, G.; Degroote, S.; Perini, J. M.; Delmotte, P.; Scharfman, A.; Davril, M.; Lo-Guidice, J. M.; Houdret, N.; Dumur, V.; Klein, A.; Rousse, P. *Glycoconjugate J.* **2001**, *18*, 661–684.
7. Thomsen, D. R.; Post, L. E.; Elhammer, A. P. *J. Cell. Biochem.* **1990**, *43*, 67–79.
8. Lopez, M.; Tetaert, D.; Juliant, S.; Gazon, M.; Cerutti, M.; Verbert, A.; Delannoy, P. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1427*, 46–61.
9. Kramerov, A. A.; Arbatsky, N. P.; Rozovsky, Y. M.; Mikhaleva, E. A.; Poleskaya, O. O.; Gvozdev, V. A.; Shibaev, V. N. *FEBS Lett.* **1996**, *378*, 213–218.
10. Weske, B.; Dennis, R. D.; Helling, F.; Keller, M.; Nores, G. A.; Peter-Katalinic, J.; Egge, H.; Dabrowski, U.; Wiegandt, H. *Eur. J. Biochem.* **1990**, *191*, 379–388.
11. Helling, F.; Dennis, R. D.; Weske, B.; Nores, G.; Peter-Katalinic, J.; Dabrowski, U.; Egge, H.; Wiegandt, H. *Eur. J. Biochem.* **1991**, *200*, 409–421.
12. Hård, K.; van Doorn, J. M.; Thomas-Oates, J. E.; Kamerling, J. P.; van der Horst, D. J. *Biochemistry* **1993**, *32*, 766–775.
13. Hanisch, F. G.; Uhlenbruck, G. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **1984**, *365*, 119–128.
14. Wieruszkeski, J. M.; Michalski, J. C.; Montreuil, J.; Strecker, G.; Peter-Katalinic, J.; Egge, H.; van Halbeek, H.; Mutsaers, J. H.; Vliegthart, J. F. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 6650–6657.
15. Bidlingmeyer, B. A.; Cohen, S. A.; Travin, T. L. *J. Chromatogr.* **1984**, *336*, 93–104.
16. Zanetta, J. P.; Timmerman, P.; Leroy, Y. *Glycobiology* **1999**, *9*, 255–266.
17. Trinel, P. A.; Maes, E.; Zanetta, J. P.; Delplace, F.; Coddeville, B.; Jouault, T.; Strecker, G.; Poulain, D. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 37260–37271.
18. Kamerling, J. P.; Vliegthart, J. F. G. In *Biological Magnetic Resonance*; Plenum Press: New York, 1992; Vol. 10.
19. Coppin, A.; Maes, E.; Morelle, W.; Strecker, G. *Eur. J. Biochem.* **1999**, *265*, 94–104.
20. Shashkov, A. S.; Kondakova, A. N.; Senchenkova, S. N.; Zych, K.; Toukach, F. V.; Knirel, Y. A.; Sidorchuk, Z. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 601–605.
21. Florea, D.; Maes, E.; Haddad, M.; Strecker, G. *Biochimie* **2002**, *84*, 611–624.
22. Capon, C.; Wieruszkeski, J. M.; Lemoine, J.; Byrd, J. C.; Leffler, H.; Kim, Y. S. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 31957–31968.










# Structural characterization of complex O-linked glycans from insects

Garenaux, E.<sup>1</sup>; Yu, S.Y<sup>2</sup>; Levêque S.<sup>1</sup>; Maes E.<sup>1</sup> and Guérardel, Y<sup>1</sup>.

[1]Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UMR 8576 CNRS, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655, Villeneuve d'Ascq cedex, France

[2] Institute of Biochemical Sciences, National Taiwan University, Taipei, 106, Taiwan.

## Symbol used

 -ol	GalNAc-ol	
	HexNAc	
	Hex	
	Fuc	
	$\alpha$ GlcNAc	
	$\beta$ Gal	
AEP	AminoEthylPhosphate (phosphoethanolamine)	

## Abstract

In order to investigate the O-glycans diversity in insects, we used common wasp nest (*Vespula germanica*) and hornet nest (*Vespa crabro*) as starting material. These materials were submitted to reductive beta elimination and the released oligosaccharide alditols were further fractionated by multidimensional HPLC. Tandem mass spectrometry analysis combined with NMR data revealed the presence of various families of complex O-glycans differing accordingly to both core structures and external motifs. Glycans from wasp were characterized by the presence of core types 1 and 2, Lewis x and internal Gal-Gal motifs. We also observed unusual O-glycans containing a reducing *N*-acetylgalactosamine unit directly substituted by a fucose residue. In contrast, hornet O-glycans appeared as a rather homogeneous family of core 1 type O-glycans extended by galactose oligomers.

## Introduction

Whereas many data are available on the structures, functions and metabolism of mammalian glycoproteins O-glycans, few is known about those in other phyla and particularly in insects. The O-glycans, which have been extensively studied on mammals, particularly in human, but also in amphibians and fishes, show species specificity and a broad variety of structures, leading to the deciphering of hundreds of different O-glycans (<http://glycobase.univ-lille1.fr/base/>). There is an evident contrast between the numerous known insect species and the lack of structural data concerning glycosylation in those organisms. Glycosylation in insects is of interest not only to enlighten diversity of glycans structures, but also to determine the origin of some allergenic carbohydrate determinants (Rendic *et al.*, 2007). Furthermore, development of insect expression systems to produce therapeutic recombinant proteins has awakened the need to characterize glycosylation potential of insect cells.

N-glycosylation of insects exhibits a wide variety. Model organism *Drosophila melanogaster* has been extensively studied, leading to the observation of oligomannosyl type as well as truncated core difucosylated N-glycans (North *et al.*, 2006). Glycoproteins from honey-bee (*Apis mellifera*), such as phospholipase A2, carry N-linked oligosaccharides with two types of ( $\alpha$ 1,3)fucosylation: modification by a Fuc( $\alpha$ 1,3) on the innermost core GlcNAc, which constitutes an epitope recognized by IgE from some bee-venom allergic patient and an antennal Lewis-like GalNAc $\beta$ 1,4(Fuc $\alpha$ 1,3)GlcNAc moiety (Hasslam *et al.*, 1994; Rendic *et al.*, 2007). Finally, charged phosphoethanolamine substituted N-glycans were observed in the locust *Locustae migratoria* (Hård *et al.*, 1993).

On the contrary, data concerning O-glycosylation suggest that insects surprisingly produce very homogeneous, basic structures, whereas most animals exhibit an astonishing diversity of O-linked oligosaccharides on mucin-type glycoproteins. First report concerning O-glycosylation in insects show that they seem only able to synthesize Tn (GalNAc-O-Ser/Thr) and T antigen (Gal $\beta$ 1,3GalNAc-O-Ser/Thr) (Thomsen *et al.*, 1990) corresponding to the unique structures described later in *drosophila* O-glycans (Kramerov *et al.*, 1996). Those observations were further confirmed in Lepidopteran cell lines by studying structural feature of O-glycosylation by lectin profiling and measurement of glycosyltransferases activities involved in O-glycan biosynthesis (Lopez *et al.*, 1999), evidencing major presence of mono

and disaccharide Tn and T antigen. Additionally, this study pointed out that O-glycosylation potential depends on the cell line. Indeed, only one of the three species, *Mamestra brassicae*, exhibits a UDP-Gal: [Gal $\beta$ 1,3GalNAc] ( $\alpha$ 1,4)-galactosyltransferase, suggesting an ability to produce complex O-glycans.

In a first study (Maes *et al.*, 2005), we confirmed the presence of major Gal( $\beta$ 1-3)GalNAc- $\alpha$ -Ser/Thr and GalNAc- $\alpha$ -Ser/Thr in wasp. Among those ubiquitous structures, wasp's salivary mucins also contain charged O-glycans substituted by a phosphoethanolamine group. Various phosphoethanolamine containing glycoconjugates have already been described in insects. In particular, N-glycans of *Locusta migratoria*, as well as zwitterionic glycolipids from *drosophila* (Seppo and Tiemeyer, 2000) and from the synanthropic fly *Calliphora vicina* (Helling *et al.*, 1991). Those two insect species also exhibit acidic glycolipids substituted by both glucuronic acid and phosphoethanolamine (Seppo *et al.*, 2000). The presence of sialic acid in insect species is still controversial. Indeed, two studies suggest the presence of sialic acid in *drosophila*. A first report (Roth *et al.*, 1992) evidenced occurrence of sialic acid by GC/MS in a stage specific pattern. Additionally, Koles and collaborators cloned and characterized an active, stage specific sialyltransferase (Koles *et al.*, 2004). But for a long time, no sialic acid containing glycoconjugate, glycolipid or glycoprotein has been described (Seppo and Tiemeyer, 2000). We suggested that the presence of phosphated substituents may be a common feature in insect glycans and a possible alternative to sialic acid to confer a charge to glycoconjugates. Only very recently, a sialylated glycan structure has been described, isolated from membrane-associated glycoproteins isolated from adult *Drosophila* brain (Koles *et al.*, 2007).

The first study of wasp glycans, focused on major compounds that could be analysed by NMR because of their large quantities. In a second step, we looked at minor components through the combined use of NMR and Mass Spectrometry (MS). We used as starting material common wasp (*Vespula germanica*) and hornet (*Vespa crabro*) nest which are mainly made of insect saliva (Villemant, 2005) and thus highly enriched in insect glycoproteins. Such strategy has already been successfully applied to swallow's nests, which were shown to be associated with salivary mucin-type glycoproteins substituted by unusual O-glycans (Wieruszski *et al.*, 1987).

## Results and discussion

### 1. Structural analysis of O-glycans from wasp

A previous report (Maes *et al.*, 2005) established the structure of major mucin type O-glycans synthesised by wasp, by analysing the oligosaccharide-alditols released from the nest of common wasp *Vespula germanica*. This material is known to be mainly composed of wasp salivary mucins and so appears as a relevant starting material for screening glycosylation potential of wasp. Released oligosaccharide-alditols were fractionated by HPLC on a primary bounded amino column in five peaks labelled **1** to **5** which were individually collected and analysed by high resolution liquid NMR (Fig. 1). As summarized in **Table 1**, in addition to ubiquitously found GalNAc- $\alpha$ -Ser/Thr and Gal $\beta$ 1-3GalNAc- $\alpha$ -Ser/Thr (respectively fraction **1** and **2**), we showed that nest from wasp contains large quantities of phosphoethanolamine substituted O-glycans (fraction **4** and **5**) Etn-*P*-(*O*→6)-GalNAc-ol and Etn-*P*-(*O*→6)-[Gal( $\beta$ 1-3)]GalNAc-ol that presumably originate from salivary mucins.

In a second step of analysis, we examined the O-glycan content of wasp salivary mucins by MALDI-TOF MS analysis of fractions **1** to **5** after permethylation, in order to increase sensitivity of detection. All signals observed throughout the present report were assigned to  $[M+Na]^+$  adducts of oligosaccharides. Surprisingly we detected by MS among major compounds, a heterogeneous mixture of minor oligosaccharides in each HPLC fraction **1** to **5** (**Fig. 1**). According to their *m/z* values, minor components were assigned as neutral, complex O-glycans, larger than T and Tn antigens. Those compounds were not detectable by NMR analyses due to their low quantities and the heterogeneity of the mixtures. **Table 1** summarizes the calculated compositions of minor oligosaccharides detected in each HPLC fraction. Observation of oligosaccharides with identical *m/z* values in different HPLC fractions suggested the presence of isobaric oligosaccharides in different HPLC fractions. Furthermore, tandem mass spectrometry analyses (ESI-MS/MS) of native and permethylated oligosaccharides in each HPLC fraction also revealed the presence of isobaric oligosaccharides within a single fraction (**Fig. 2B** and **3A**). We took advantage of the existence of privileged cleavages of permethylated glycans to differentiate close isobaric structures. As exemplified in **Figure 2A** and **2B**, ESI-MS/MS sequencing of permethylated compounds at *m/z* 953 (deHex<sub>1</sub>Hex<sub>1</sub>HexNAc<sub>1</sub>HexNAc-ol) from normal phase fractions **2** and **4** revealed completely different fragmentation patterns, which confirmed that isobaric

structures were separated by HPLC. Ion at  $m/z$  953 from fraction **4** contains a mixture of at least two isomers, **I** and **II** (**Fig. 2B**). Indeed, observation of a pair of b/y ions at  $m/z$  486/490 revealed the presence of an unglycosylated LacNAc motif Gal( $\beta$ 1-3/4)GlcNAc that typify isomer **I** probably as Gal( $\beta$ 1-3)GlcNAc( $\beta$ 1-3)[Fuc( $\alpha$ 1-6)]GalNAc-ol or Gal( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-3)[Fuc( $\alpha$ 1-6)]GalNAc-ol. Also, intense fragment ion at  $m/z$  660 is indicative of a Hex<sub>1</sub>HexNAc<sub>1</sub>Fuc<sub>1</sub> motif whereas b-ion at 747 and low intensity secondary fragment ion at  $m/z$  454 are indicative of a Fuc( $\alpha$ 1,3) residue. Altogether, these fragment are very specific of the presence of a Lewis x motif Gal( $\beta$ 1-4)[Fuc( $\alpha$ 1-3)]GlcNAc and typify isomer **II** probably as Gal( $\beta$ 1-4)[Fuc( $\alpha$ 1-3)]GlcNAc( $\beta$ 1-3)GalNAc-ol. In addition, observation of minor signals at  $m/z$  433, 472 and 694 suggest the presence of other minor isomers. ESI-MS/MS spectrum of parent ion at  $m/z$  953 from fraction **2** (**Fig. 2A**) revealed the absence of both **I** and **II**, but the presence of another isobaric compound **III**, which will be described later.

So in order to facilitate the sequencing of glycans, normal phase HPLC fractions **2**, **4** and **5** were separately subjected to reverse-phase HPLC on a C18 column for further fractionation. Then, resulting subfractions were permethylated and screened by MALDI-TOF MS. As shown in **Table 2**, some compounds with identical  $m/z$  value were still observed in different fractions after reverse phase HPLC, which confirmed the presence of isobaric glycans within normal phase fractions **2**, **4** and **5**, as suggested before by ESI-MS/MS analyses. MS/MS analysis of individual signals after subfractionation by reverse phase HPLC demonstrated that most isobaric compounds were partially separated.

#### *Analysis of glycans from fraction 2*

Out of the six oligosaccharide signals observed in fraction **2** by MALDI-TOF MS (**Table 1**), the three major signals at  $m/z$  779, 912 and 953 could be analysed by MS/MS fragmentation after reverse phase subfractionation. Fragmentation pattern of the signal at  $m/z$  779 (Hex<sub>1</sub>HexNAc<sub>1</sub>HexNAc-ol<sub>1</sub>) exhibit two prominent fragment ions at  $m/z$  504 and 520 indicative of the core 1 based sequence HexNAc-Hex-1,3-HexNAc-ol (compound **IV**) (**Fig. 3A**). In addition, minor signals at  $m/z$  486 and 543 are indicative of the sequences HexNAc-1,6-[Hex-1,3]HexNAc-ol (compound **V**) and Hex-HexNAc-HexNAc-ol (compound **VI**), respectively. The low intensity of these two signals strongly suggests that **V** and **VI** are minor compounds compared with **IV**. Fraction **2** was subfractionated by reverse phase HPLC in

fractions **2.1**, **2.2** and **2.3**, which enabled a complete purification of compounds **IV** and **VI** in fraction **2.2** and **2.3**, respectively, as demonstrated by their fragmentation patterns (Fig. **3C** and **3D**). Accordingly, monosaccharide composition of fraction **2.2** revealed the presence of Gal, GlcNAc and GalNAc-ol. Owing to sufficient quantities, fraction **2.2** was further analysed on a 600 MHz NMR spectroscope fitted with a cryoprobe (Fig. **4**).  $^1\text{H}$  NMR parameters of compound **IV** were attributed by  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (Table **3**). GalNAc-ol unit was unambiguously characterised by its H-2, H-5 and NAc signals at 3.888 4.185 and 2.508 ppm, respectively. These chemical shifts perfectly matched those of core 1 structure, in agreement with MS/MS analysis. This was confirmed by the presence of a  $\beta$ -Gal unit, as shown by  $\beta$  anomeric proton at 4.524 ppm, related to a  $\beta$ -galacto  $^3J$  spin system. Additional anomeric proton at 4.865 ppm was attributed to an  $\alpha$ -gluco spin system, as demonstrated by  $^3J$  coupling. Its correlation with an N-acetamido proton at 2.090 ppm allowed attribution of this spin system as an  $\alpha$ -GlcNAc residue.  $\alpha$ 1,4-O-linkage of this  $\alpha$ -GlcNAc unit onto  $\beta$ -Gal is demonstrated by the downfield shift of the H-4  $\beta$ -Gal compared to a terminal core 1  $\beta$ -Gal. Finally, all chemical shifts perfectly matched with the previously described **GlcNAc( $\alpha$ 1,4)Gal( $\beta$ 1,3)GalNAc-ol** oligosaccharide, isolated from jelly-coat mucins of amphibian *Rana palustris* (Maes *et al.*, 1999; <http://glycobase.univ-lille1.fr/base/>). Complete absence of z ion at m/z 543 in fragmentation pattern of the pure compound **VI** established the linkage of Hex to HexNAc as 1,4 rather than 1,3, which strongly suggests the nature of this compound as the ubiquitous type 2 LacNAc containing **Gal( $\beta$ 1,4)GlcNAc( $\beta$ 1,3)GalNAc-ol** oligosaccharide (Fig **3D**). However, the extremely low quantities of this compound prevented further analysis in order to confirm this result.

Analysis of deHex<sub>1</sub>Hex<sub>2</sub>HexNAc-ol at m/z 912 (compound **VII**) of subfraction **2.1** by MS/MS showed a prominent pair of c/z ions at 637/298 indicative of a linear core 1 O-glycan (data not shown). Presence of b/y pair at m/z 415/520 and secondary fragment at m/z 449 unambiguously established the sequence deHex-Hex-1,4-Hex-1,3-HexNAc-ol. Departure of Fuc residue through z-type cleavage exclusively, as observed by the presence of [M-188] signal at m/z 724, indicates that Fuc residue is not linked to C-3 position of terminal Hex. In combination with composition analysis, these data established the most probable structure of **VII** as **Fuc( $\alpha$ 1,2)Gal(1,4)Gal(1,3)GalNAc-ol**. Considering the novelty of this O-glycan, the isomery of Gal residues cannot be inferred from the proposed sequence.

MS/MS spectrum of **III** at m/z 953 (deHex<sub>1</sub>Hex<sub>1</sub>HexNAc<sub>1</sub>HexNAc-ol<sub>1</sub>) in fraction **2**, exhibited a fragmentation pattern very similar to pure compound **IV** (data not shown), which

strongly suggested the presence of a fucosylated equivalent of compound **IV**, based on HexNAc-Hex-1,3-HexNAc-ol core sequence (Fig. **2A**). Prominent fragment ions at  $m/z$  678 and 694 demonstrated that the Fuc residue was localized on the internal Hex residue, whereas absence of [M-206] fragment ion at  $m/z$  747 established that the fucose was not linked through a 1,3 linkage, but rather through a 1,2 linkage as suggested by the exclusive presence of a [M-188] fragment ion at  $m/z$  765. Based on complete sequencing of compound **IV** and similarities of MS/MS fragmentation patterns of **IV** and **III**, we suggest that compound **III** has the following structure: **GlcNAc( $\alpha$ 1,4)[Fuc( $\alpha$ 1,2)]Gal( $\beta$ 1,3)GalNAc-ol**. In addition, a low intensity fragment ion at  $m/z$  490 suggested the presence of a minor compound that was subsequently isolated by reverse phase subfractionation in subfraction **2.1**. Its fragmentation pattern (data not shown) established that its structure was identical to **I Gal( $\beta$ 1,4)GlcNAc( $\beta$ 1,3)[Fuc( $\alpha$ 1-6)]GalNAc-ol** oligosaccharide.

#### *Analysis of glycans from fraction 4*

Subfractionation of fraction **4** by reverse phase HPLC permitted to obtain two essentially pure isobaric oligosaccharides with deHex<sub>1</sub>Hex<sub>1</sub>HexNAc<sub>1</sub>HexNAc-ol composition. As demonstrated by comparing Figures **2B**, **2C** and **2D**, compounds **I** and **II** which were observed in mixture on total fraction **4** were highly enriched in subfractions **2.2** and **2.1**, respectively. This permitted to establish that **I** contained a type 2 LacNAc motif Gal( $\beta$ 1-4)GlcNAc, and no type 1 as shown by the absence of  $z$  cleavage between Gal and GlcNAc residues at  $m/z$  717, which establish structure of **I** as **Gal( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-3)[Fuc( $\alpha$ 1-6)]GalNAc-ol**. Fragment ion at  $m/z$  717 was observed in total fraction **4**, but could not be attributed to compound **I** specifically. Absence of this signal in both subfractions **4.1** and **4.2** confirms that some minor O-glycans, probably including the type 1 equivalent of **I Gal( $\beta$ 1-3)GlcNAc( $\beta$ 1-3)[Fuc( $\alpha$ 1-6)]GalNAc-ol**, were lost to analysis during reverse phase fractionation.

Compound **VIII** identified at  $m/z$  983 in subfraction **4.3** as Hex<sub>2</sub>HexNAc<sub>1</sub>HexNAc-ol was partially identified as **GlcNAc-Gal(1,4)Gal(1,3)GalNAc-ol** based on MS/MS fragmentation pattern and composition analysis (data not shown). Its fragmentation pattern, that was very similar to **VII**, permitted to deduce the proposed sequence owing to  $c$  type fragment ion at  $m/z$  708 (HexNAc<sub>1</sub>Hex<sub>2</sub>),  $z$  type ion at  $m/z$  724 (M-HexNAc) and secondary fragment ion at  $m/z$  449 (internal Hex<sub>2</sub>).

Then, two isobaric structures **IX** and **X** with Hex<sub>1</sub>HexNAc<sub>2</sub>HexNAc-ol compositions were totally separated by reverse phase fractionation. Indeed, parent ion at m/z 1024 from subfractions **4.1 (IX)** and **4.2 (X)** shows totally different fragmentation patterns. **IX** was characterized by a core 1 Gal(β1,3)GalNAc-ol as demonstrated by c/z fragment ions at m/z 749/298 and a very unusual HexNAc-HexNAc motif in non reducing position as demonstrated by the b/y ion pairs at m/z 527/520 and 282/765 (Fig **5A**). In contrast, **X** was characterized by a core 3 GlcNAc(β1,3)GalNAc-ol as demonstrated by b/y fragment ions at m/z 731/316 a HexNAc-Hex motif in non reducing position as demonstrated by the c/z ion pair at m/z 504/543 and b/y ion pair at m/z 282/765 (Fig **5B**). Thus, MS/MS and composition data suggest the partial structure for **IX** as **HexNAc-HexNAc-Gal(1,3)GalNAc-ol** and for **X** as **HexNAc-Gal(1,3)GlcNAc(1,3)GalNAc-ol**.

#### *Analysis of glycans from fraction 5*

A similar strategy based on MS/MS fragmentation after purification by two dimensions HPLC permitted to identify seven O-glycans of higher complexity in fraction **5**, as summarized in **Table 2**. Of particular interest are the isobaric components with deHex<sub>1</sub>Hex<sub>2</sub>HexNAc<sub>1</sub>HexNAc-ol composition observed at m/z 1157 in subfractions **5.1**, **5.2** and **5.5**. As previously observed, MS/MS analysis demonstrated the presence of different isobaric glycans in all three fractions. Most interesting was fraction **5.2** which contained two major Lewis x substituted O-glycans, **XI** and **XII**. **XI** is a linear core 3 glycan and **XII** a branched core 2 glycan as demonstrated by the presence of c and z-type fragments ions at m/z 882 and 921, respectively (Fig. **6A**). Presence of intense c/y ion pair at m/z 660/520 typifies terminal deHex<sub>1</sub>Hex<sub>1</sub>HexNAc<sub>1</sub> motif, whereas release of Fuc residue from parent ion through z-type cleavage at m/z 951 is very specific of 1,3-linkage. Then secondary fragments observed at m/z 676 and 715 that result from the release of 1,3-linked Fuc unambiguously identify the presence of Lewis x motif on fragments 882 and 921, respectively. These data established with good confidence the structures of **XI** and **XII** as classical **Gal(β1,4)[Fuc(α1-3)]GlcNAc(β1,3)Gal(β1-3)GalNAc-ol** and **Gal(β1,4)[Fuc(α1-3)]GlcNAc(β1,6)[Gal(β1-3)]GalNAc-ol**. In contrast, none of the fragment ions indicative of Lewis x motifs were observed in isobaric compounds from subfractions **5.1** and **5.5**. Indeed, fraction **5.5** was shown to contain a single compound **XIII** characterized by the presence of an unglycosylated Hex-Hex-HexNAc branch and a fucosylated GalNAc-ol residue (Fig. **6B**).



## 2. Structural analysis of O-glycans from hornet

In order to establish if the presence of complex O-glycans was restricted to wasp, we screened the glycosylation profile of related species *Vespa crabro* by using nests as starting material. Glycoproteins were purified and released oligosaccharide-alditols from hornet were purified on a biogel P2 column and separated by normal phase HPLC. In identical experimental conditions, chromatograph obtained from hornet glycans was much more heterogeneous than the one obtained with glycans from wasp (Fig. 7A). Each peak was individually collected and systematically analysed by MALDI-MS (Fig. 7B-E). Peaks devoid of oligosaccharides are marked by an asterisk. In contrast to wasp, each fraction were characterized by the presence of a single signal, indicating that the separation was efficient. Table 4 summarizes calculated compositions of identified compounds. Contrarily to wasp, we did not observe any phosphorylated O-glycans in hornets. It seems that in hornets, phosphate and phosphoethanolamine are substituting preferentially N-glycans, according to preliminary  $^{31}\text{P}$  NMR analysis of N-glycans (data not shown). Then, O-glycans were sequenced by tandem mass spectrometry as permethylated derivatives in order to provide maximum information. Overall, these experiments indicated that isobaric heterogeneity was lower in O-glycans from hornet compared to wasp which made sequencing easier by ESI-MS/MS. Deduced sequences are summarized in Table 4.


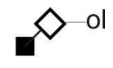

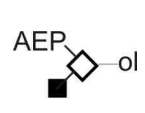
Systematic fragmentation of glycans at  $m/z$  534, 708 and 779 in fractions 1, 2 and 3 established the presence of Hex-1,3-HexNAc-ol, deHex-Hex-1,3-HexNAc-ol and Hex-1,3-(HexNAc-1,4-)-HexNAc-ol which strongly suggests the presence of the small ubiquitously found O-glycans **Gal( $\beta$ 1,3)GalNAc-ol**, **Fuc( $\alpha$ 1,2)Gal( $\beta$ 1,3)GalNAc-ol** and **Gal( $\beta$ 1,3)[GlcNAc( $\alpha$ 1,6)]GalNAc-ol**, respectively. Also, two isobaric glycans XIV and XV with Hex<sub>2</sub>HexNAc-ol composition were identified in fractions 2 and 4, respectively. Fragmentation patterns of both glycans were characterized by prominent b and c ions at  $m/z$  520 and 463, typifying the sequence Hex-Hex-HexNAc-ol (Fig. 8A). XV differed from XIV exclusively by the presence of c/z ion pair at  $m/z$  259/502 which indicated that the terminal Hex residue is linked to internal Hex residue in 1,3. These data established the partial structures of XV and XIV as **Gal(1,3)Gal(1,3)GalNAc-ol** and **Gal(1,4)Gal(1,3)GalNAc-ol**, respectively. XV may be further extended by a Fuc residue as observed on glycan deHex<sub>1</sub>Hex<sub>2</sub>HexNAc-ol at  $m/z$  912 in fractions 4 and 5. Along with c ion at  $m/z$  637, simultaneous presence of y ions at  $m/z$  520 and 694 demonstrated the presence of Fuc residue

on either terminal or internal Gal residue (Fig. **8B**). Observation of both intense [M-206] and [M-188] ions at m/z 706 and 724 strongly suggests that Fuc residues may be linked by 1,2 and 1,3 linkage. **XV** may also similarly be extended by another Hex residue to form either a linear or branched Hex<sub>3</sub> motif. Indeed, fragmentation of Hex<sub>3</sub>HexNAc-ol glycan in fraction **7** generated an intense c ion at m/z 667 (Hex<sub>3</sub>) as well as three y ions at m/z 724, 520 and 316 resulting from sequential cleavage of Hex residues and indicative of the structure **XVII Gal(1,4)Gal(1,4)Gal(1,3)GalNAc-ol (Fig. 8C)**. In addition to the linear isomer, fraction **6** contained the branched isomer **XVIII Gal(1,4)[Gal(1,3)]Gal(1,3)GalNAc-ol** as demonstrated by simultaneous presence of z ion at m/z 706 indicative of a terminal 1,3 linked Hex residue and secondary fragment at m/z 506 indicative of the release of two terminal hex residues. Finally, glycan **XIX** was identified as an extension of **XV** with a HexNAc residue in terminal non reducing position (Fig. **8D**).

Altogether, tandem mass spectrometry analyses revealed that hornet synthesizes a rather homogeneous family of core 1 type O-glycans extended by galactose oligomers with internal GalGal motifs (Table **4**). Quick diagnosis for the presence of this internal Gal-Gal motif was owing to characteristic secondary fragment at m/z 449.

Finally, through the combined use of HPLC, mass spectrometry and NMR, we described for the first time complex O-glycans structures in two insect species. Those complex structures are minor compounds and have been overlooked during a first analysis of wasp *Vespula germanica* conducted by NMR. Thus, in addition to already described major compounds in wasps (Maes *et al.*, 2005), we showed the presence of very diverse O-glycans, containing Lewis x motif, core 1, 2 and 3 and internal Gal-Gal. Furthermore, we described in wasps two unusual compounds exhibiting N-acetylgalactosamine unit directly substituted by a fucose residue as probed by fragment ion at m/z 490. To date, a single report described this kind of fucosylation, isolated from bovine submaxillary mucins: Fuc(β1,6)GalNAc (Martensson *et al.*, 1998). Conversely, hornet's O-glycans appeared as a rather homogeneous family of neutral core 1 type O-glycans extended by galactose oligomers.

**Table 1:** Summary of oligosaccharides-alditols identified by NMR (Maes et al., 2005) and MS from wasp after normal phase HPLC. Oligosaccharides were analysed by MS as permethylated derivatives. All signals were attributed to  $[M+Na]^+$  adducts.

<i>HPLC fraction</i>	<i>Major compound (NMR analyses)</i>	<i>Minor compounds (MALDI-TOF analyses)</i>				
		<i>m/z</i>	<i>Assignment</i>			
			<i>HN-ol</i>	<i>dH</i>	<i>H</i>	<i>HN</i>
<b>1</b>		None				
<b>2</b>		708	1	1	1	
		738	1		2	
		779	1		1	1
		912	1	1	2	
		953	1	2	2	1
		983	1		2	1
<b>3</b>	AEP-hexene-tetrol	779	1		1	1
		912	1	1	2	
<b>4</b>		779	1		1	1
		912	1	1	2	
		953	1	1	1	1
		983	1		2	1
		1024	1		1	2
<b>5</b>		983	1		2	1
		1157	1	1	2	1
		1187	1		3	1
		1228	1		2	2
		1331	1	2	2	1

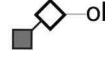
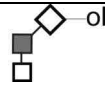
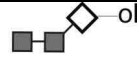
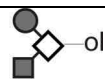
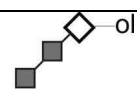
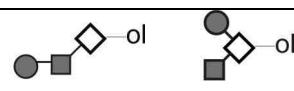
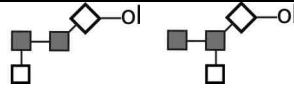
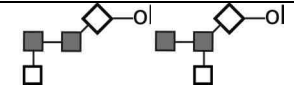
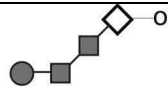
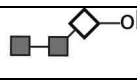
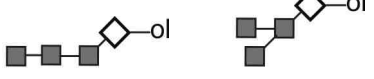
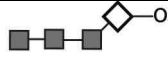
**Table 2:** Assignment of molecular ions observed by MALDI-TOF analysis of permethylated O- glycans from wasp after purification by two dimensions HPLC. NP, fractions from normal phase HPLC; RP, subfractions from reverse phase HPLC; GC/MS, composition analyses of NP fractions by gas-chromatography coupled to mass spectrometry.

NP	RP	Monosaccharides <i>GC/MS</i>	Signal ( <i>m/z</i> )	Assignment				Proposed structure <i>Tandem MS</i>	
				HN-ol	dH	H	HN		
2	1	Fuc	779	1		1	1		
		Gal	912	1	1	2			
		GlcNAc	953	1	1	1	1		
	2	Gal GlcNAc	779	1		1	1		
	3	Gal GlcNAc GalNAc	779	1		1	1		
4	1	Fuc	953	1	1	1	1		
		Gal GlcNAc GalNAc	1024	1		1	2		
	2	Fuc	953	1	1	1	1		
		Gal GlcNAc GalNAc	1024	1		1	2		
	3	Gal GlcNAc	983	1		2	1		
5	1	Fuc	983	1		2	1	-	
		Gal GlcNAc	1157	1	1	2	1		
	2	Fuc	983	1		2	1	-	
		Gal GalNAc GlcNAc	1157	1	1	2	1		
	3	Fuc	983	1		2	1	-	
		Gal	1157	1	1	2	1		
		GalNAc GlcNAc	1187	1		3	1		
	4	Gal GalNAc GlcNAc	983	1		2	1	-	
			1187	1		3	1		
	5	-	1157						

**Table 3:** <sup>1</sup>H-NMR chemical shifts of reduced O-glycan **IV** from wasp isolated in subfraction 2.2.

Residues	Protons	Chemical shift ( $\delta$ ppm)
GalNAc-ol	H-1/H-1'	3.81, 3.76
	H-2	4.407
	H-3	4.080
	H-4	3.536
	H-5	4.198
	H-6/H-6'	3.66
	H NAc	2.058
Gal	H-1	4.524
	H-2	3.616
	H-3	3.752
	H-4	3.969
GlcNAc	H-1	4.865
	H-2	3.888
	H-3	3.805
	H-4	3.542
	H-5	4.185
	H-6/H-6'	3.80
	H NAc	2.090

**Table 4:** Oligosaccharides-alditols isolated from hornet after normal phase HPLC purification. Oligosaccharides were analysed by MS as permethylated compounds.

HPLC fraction	m/z	Assignment				Proposed structures
		HN-ol	dH	H	HN	
1	534	1		1		
2	708	1	1	1		
	738	1		2		
3	779	1		1	1	
4	738	1		2		
	779	1		1	1	
	912	1	1	2		
5	912	1	1	2		
	983	1		2	1	
6	738	1		2		
	942	1		3		
7	942	1		3		
	1157	1	1	2	1	-
8	942	1		3		-
	1157	1	1	2	1	-
9	708	1	1	1		-
10	1187	1		3	1	-
11	1146	1		4		-

## Figure legends

**Figure 1:** (A) normal phase HPLC separation of alditols-oligosaccharides released from wasp salivary mucins. MALDI-TOF analyses of permethylated fractions (A) 2, (B) 4 and (C) 5.

**Figure 2:** MS/MS sequencing of permethylated glycans deHex<sub>1</sub>Hex<sub>1</sub>HexNAc<sub>1</sub>HexNAc-ol isolated from wasp salivary mucins. MS-MS fragmentation patterns of parent ion 953 from normal phase HPLC (A) fraction 2 and (B) fraction 4. MS/MS fragmentation patterns of parent ion 953 from reverse phase HPLC of (C) subfraction 4.1 and (D) subfraction 4.2

**Figure 3:** MS/MS sequencing of permethylated glycans Hex<sub>1</sub>HexNAc<sub>1</sub>HexNAc-ol at m/z 779 isolated from wasp salivary mucins. (A) MS/MS fragmentation pattern of parent ion 779 from normal phase HPLC fraction 2. MS/MS fragmentation patterns of parent ion 779 after subfractionation by reverse phase HPLC of (B) subfraction 2.1, (C) subfraction 2.2 and (D) subfraction 2.3.

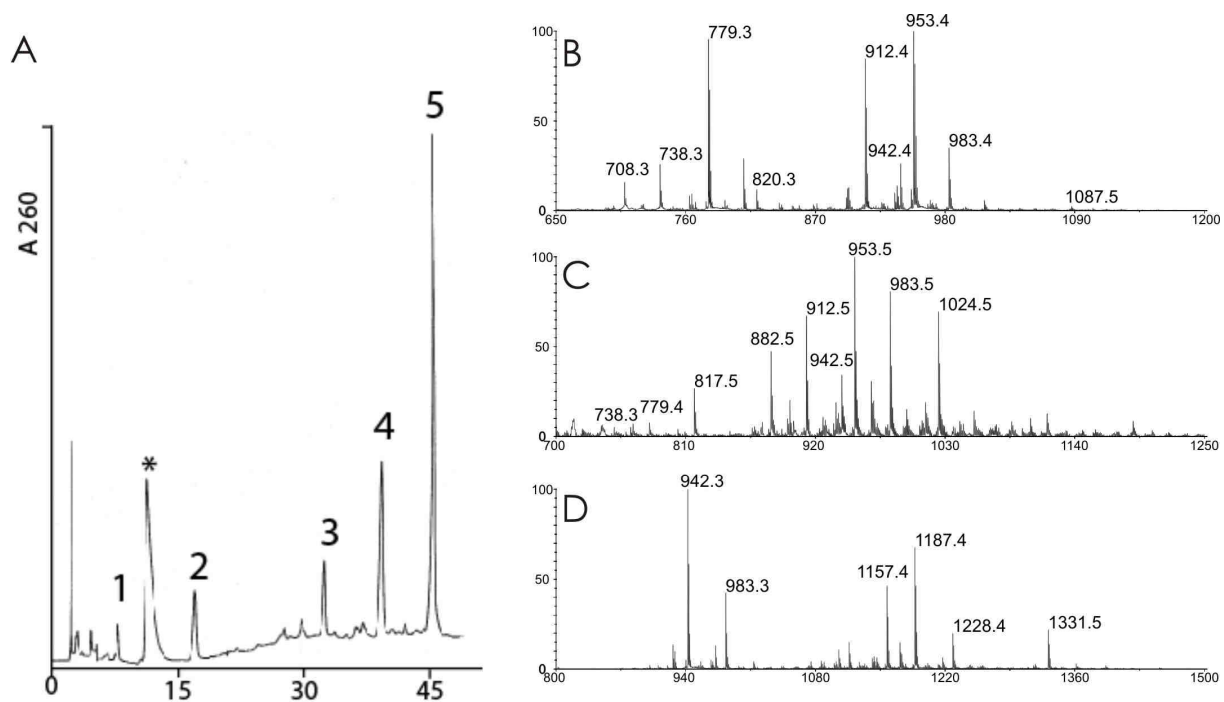
**Figure 4:** Detail of one relayed <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY of compound IV (subfraction 2.2) from wasp.

**Figure 5:** MS/MS sequencing of permethylated glycans Hex<sub>1</sub>HexNAc<sub>2</sub>HexNAc-ol at m/z 1024 isolated from wasp salivary mucins. MS/MS fragmentation patterns of parent ion 1024 from (A) subfraction 4.1 and (B) subfraction 4.2.

**Figure 6:** MS/MS sequencing of permethylated glycans deHex<sub>1</sub>Hex<sub>2</sub>HexNAc<sub>1</sub>HexNAc-ol at m/z 1157 isolated from wasp salivary mucins. MS/MS fragmentation patterns of parent ion 1157 from (A) subfraction 5.2 and (B) subfraction 5.5.

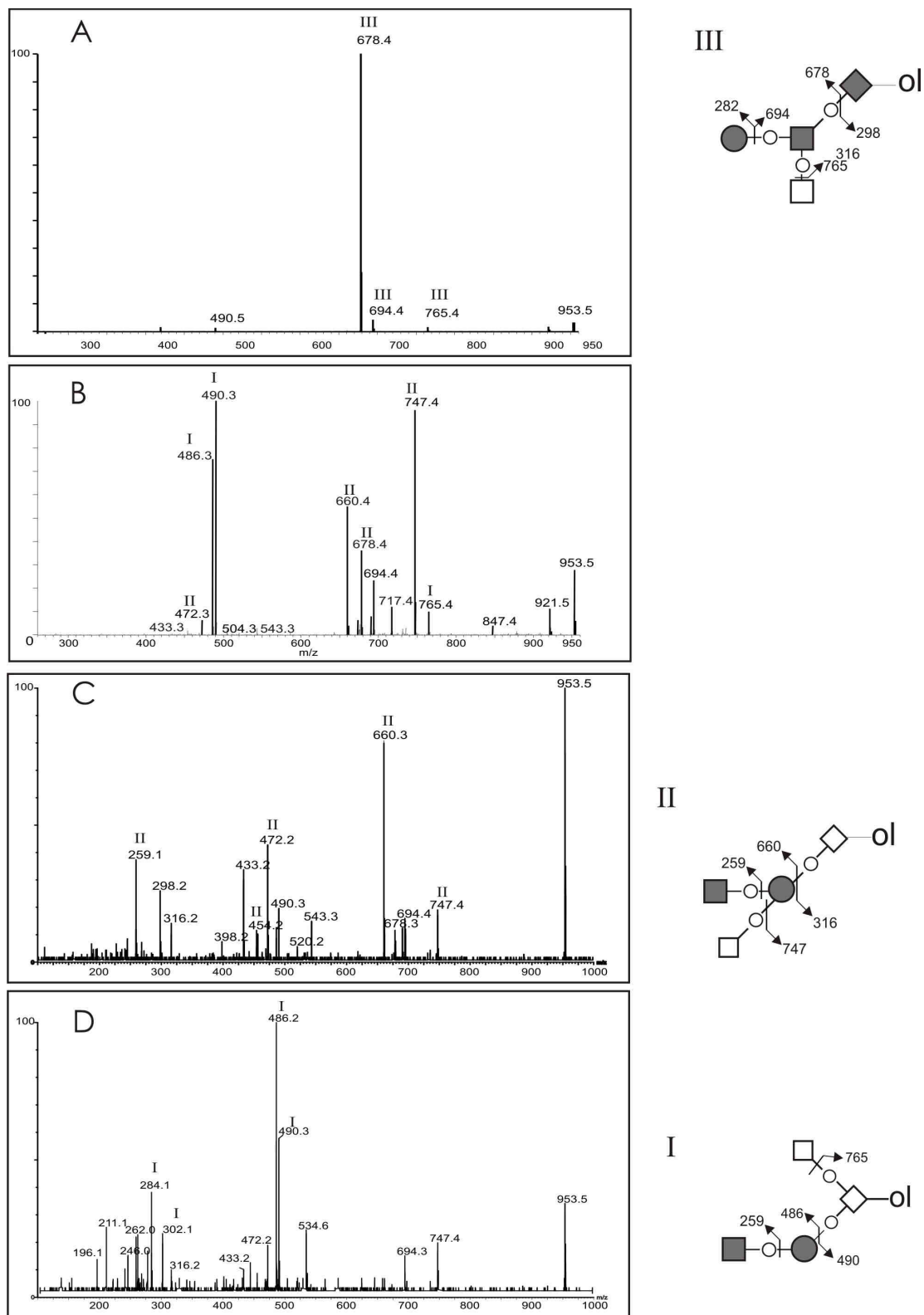
**Figure 7:** (A) HPLC separation of alditol-oligosaccharides released from hornet salivary mucins. MALDI-TOF analyses of native fractions (B) 1, (C) 2, (D) 3 and (E) 8.

**Figure 8:** MS/MS sequencing of permethylated glycans isolated from hornet salivary mucins. MS/MS fragmentation patterns of parent ions (A) 738 from fraction 2, (B) 912 from fraction 4, (C) 942 from fraction 6 and (D) 983 from fraction 5.

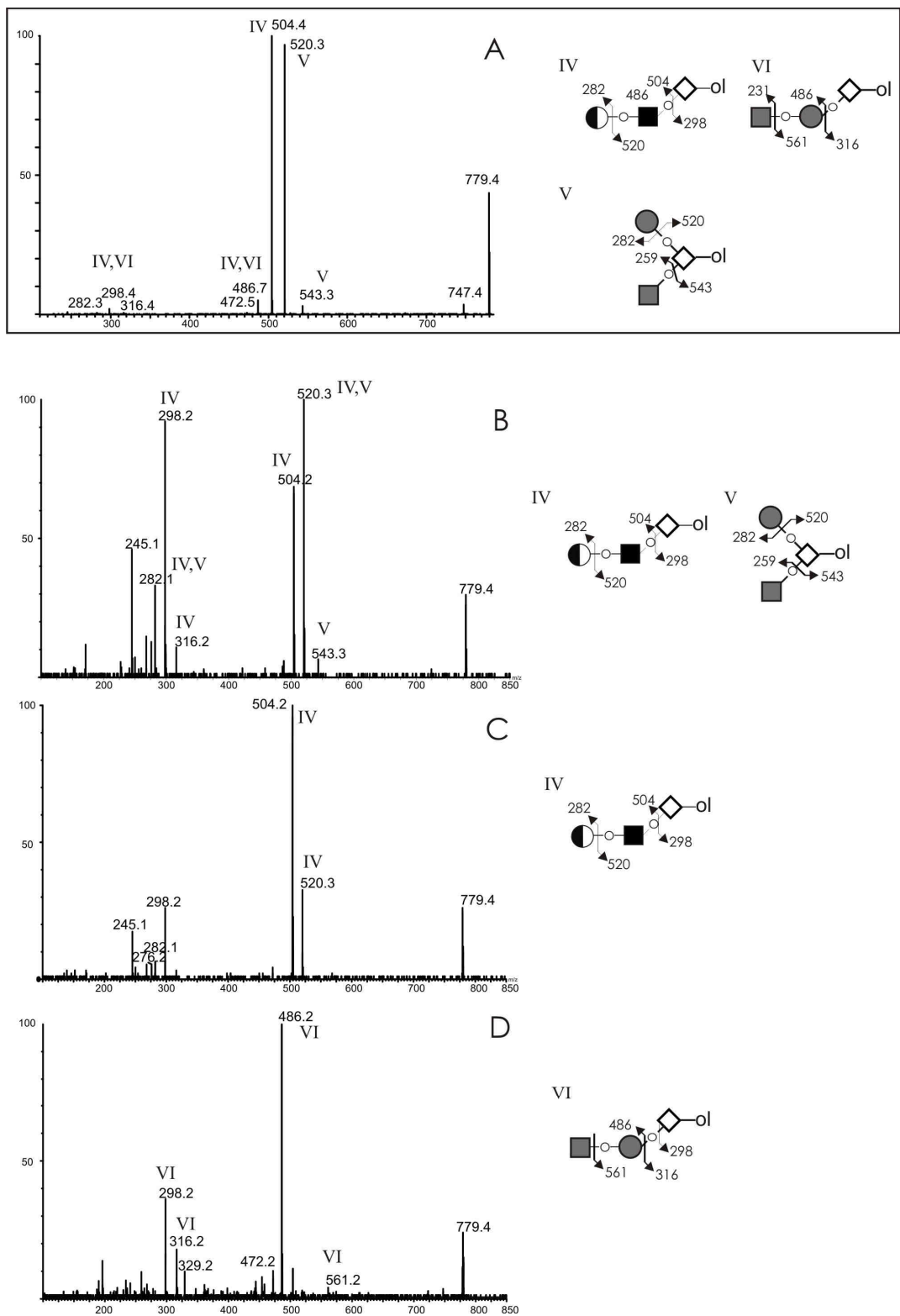


**Figure 1:** (A) normal phase HPLC separation of alditols-oligosaccharides released from wasp salivary mucins. MALDI-TOF analyses of permethylated fractions (A) 2, (B) 4 and (C) 5.

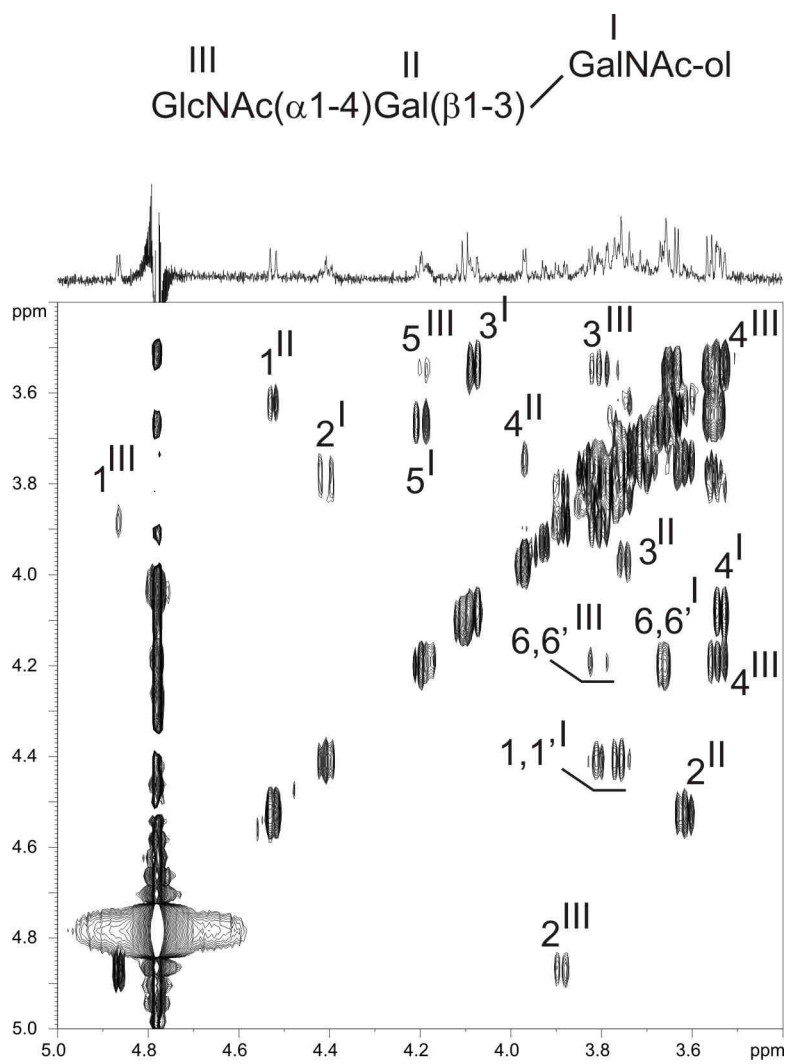




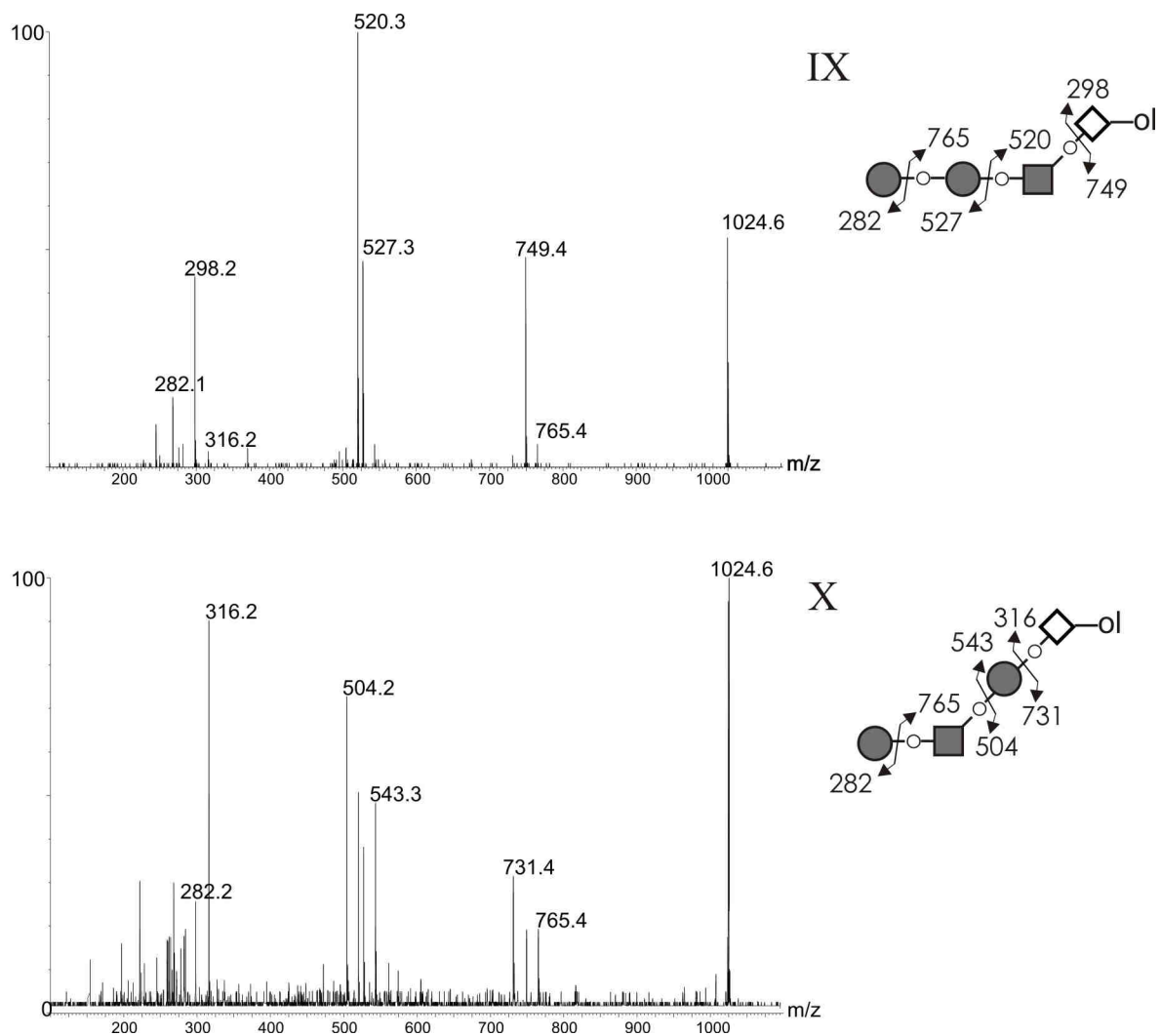
**Figure 2:** MS/MS sequencing of permethylated glycans deHex<sub>1</sub>Hex<sub>1</sub>HexNAc<sub>1</sub>HexNAc-ol isolated from wasp salivary mucins. MS-MS fragmentation patterns of parent ion 953 from normal phase HPLC (A) fraction 2 and (B) fraction 4. MS/MS fragmentation patterns of parent ion 953 from reverse phase HPLC of (C) subfraction 4.1 and (D) subfraction 4.2



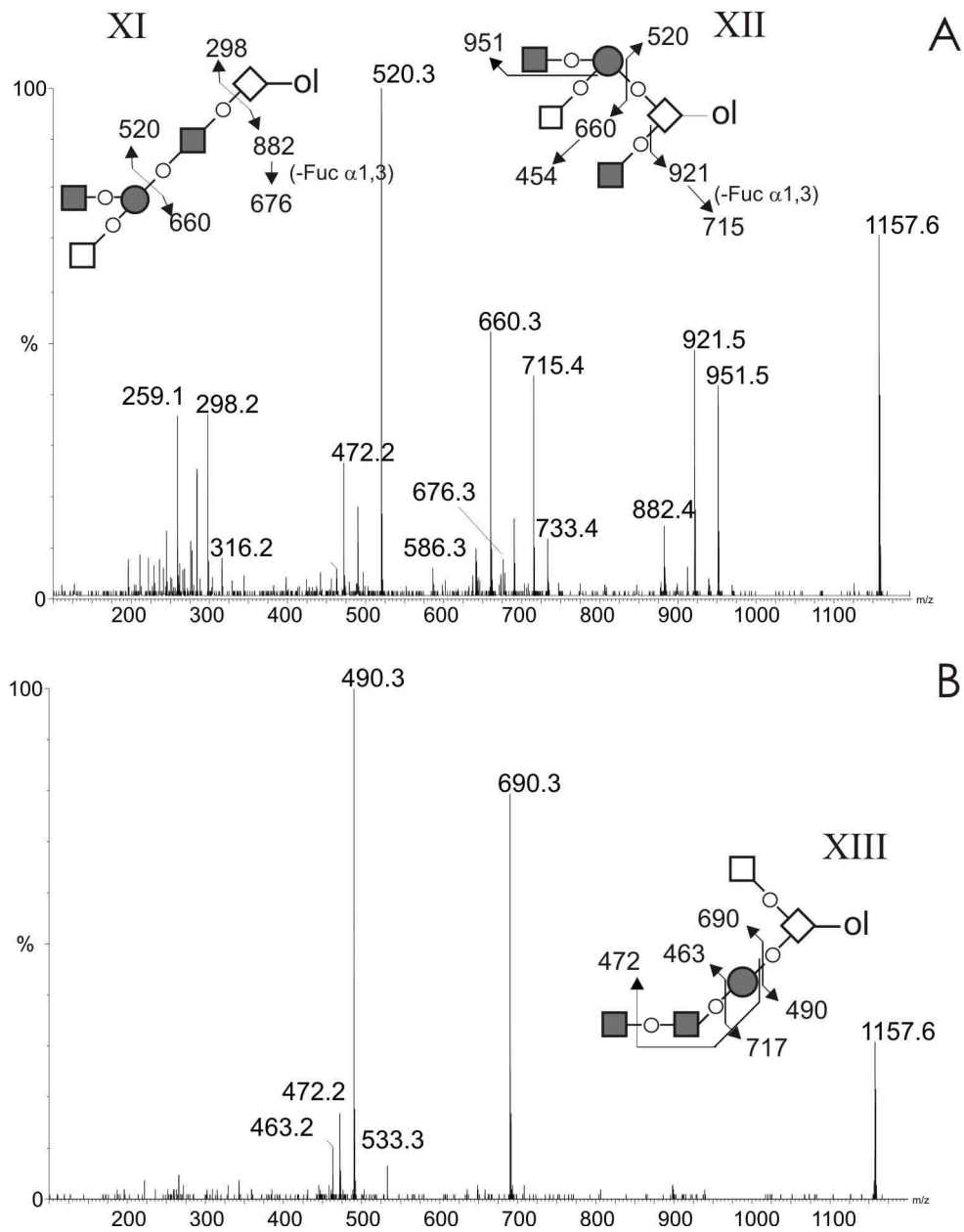
**Figure 3:** MS/MS sequencing of permethylated glycans Hex<sub>1</sub>HexNAc<sub>1</sub>HexNAc-ol at m/z 779 isolated from wasp salivary mucins. (A) MS/MS fragmentation pattern of parent ion 779 from normal phase HPLC fraction 2. MS/MS fragmentation patterns of parent ion 779 after subfractionation by reverse phase HPLC of (B) subfraction 2.1, (C) subfraction 2.2 and (D) subfraction 2.3.



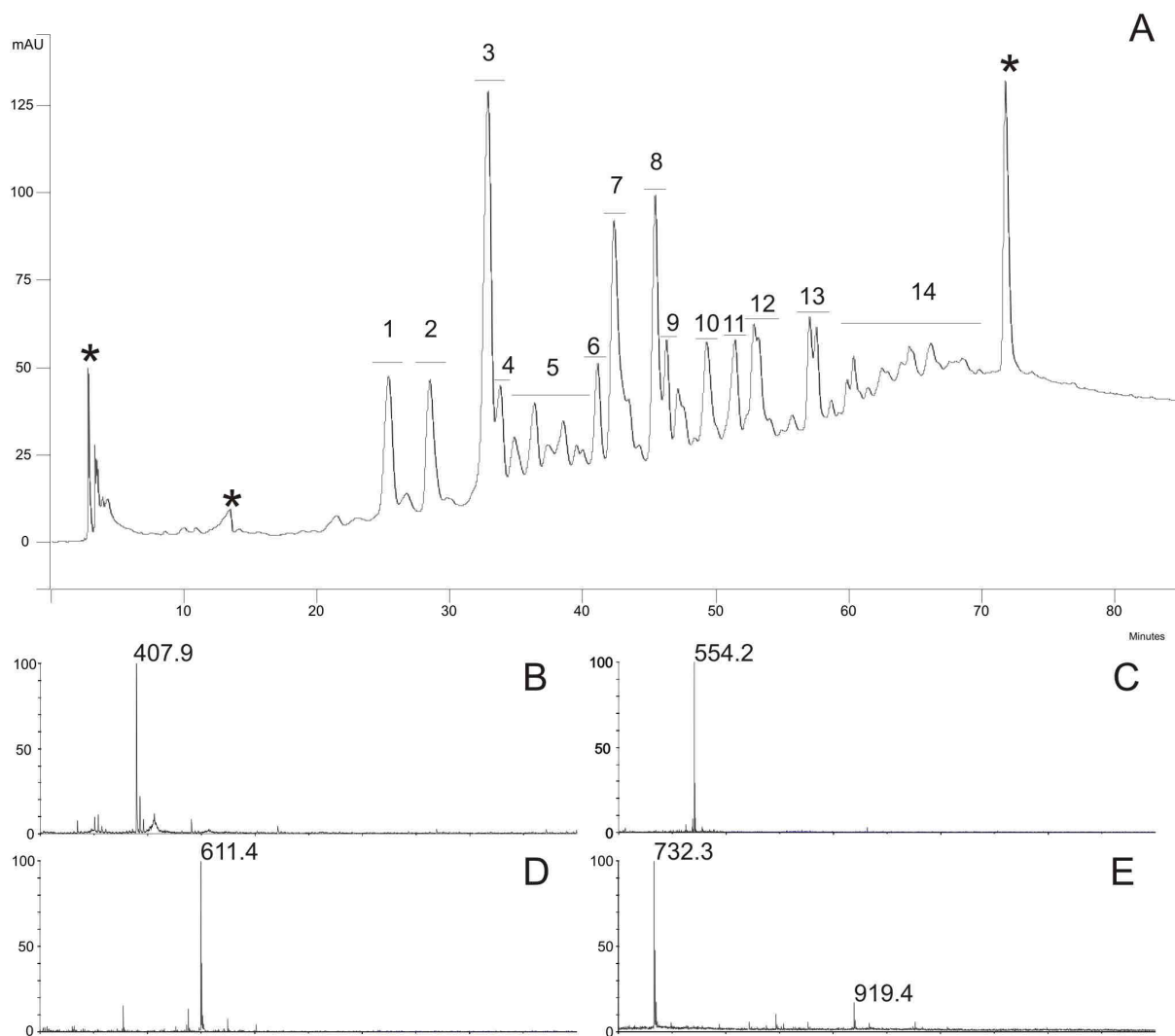
**Figure 4:** Detail of one relayed  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY of compound **IV** (subfraction **2.2**) from wasp.



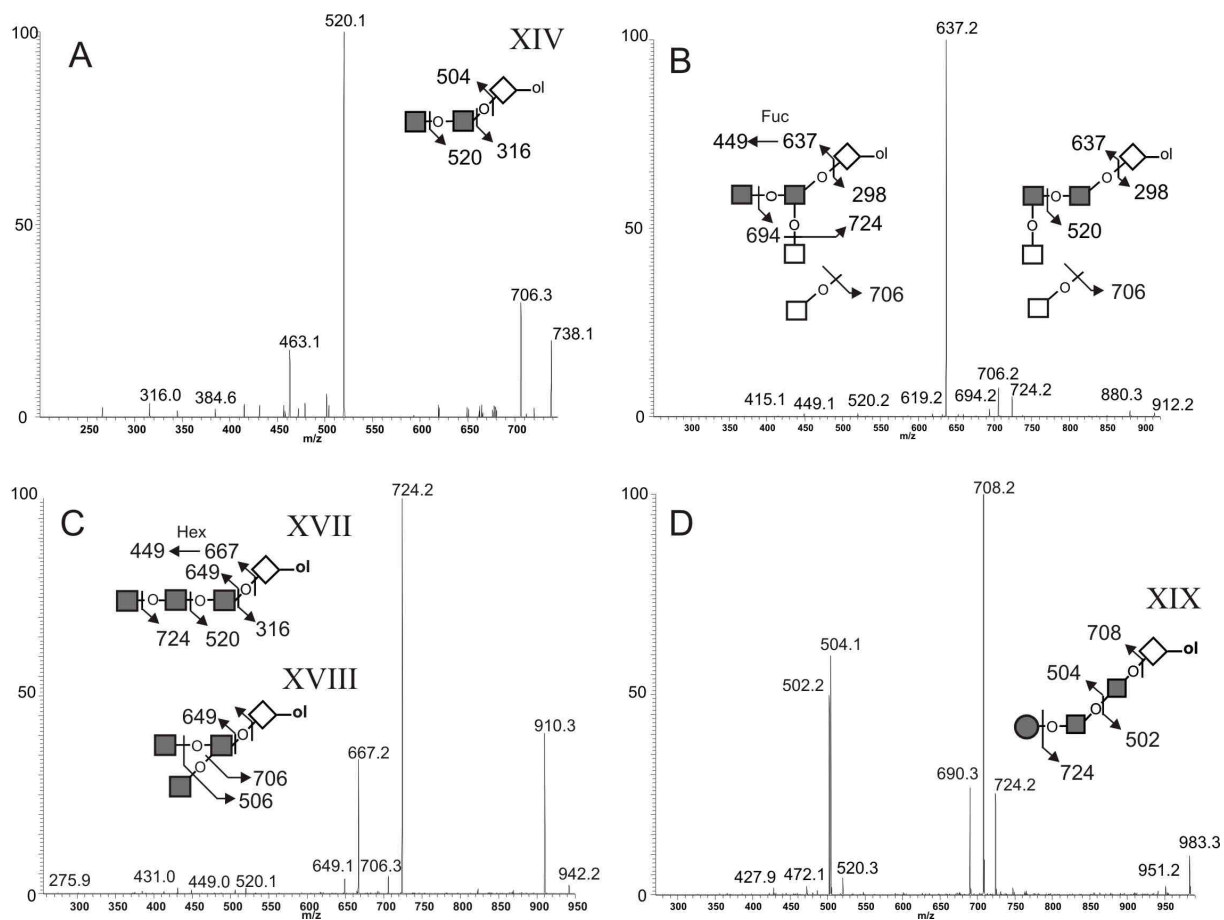
**Figure 5:** MS/MS sequencing of permethylated glycans Hex<sub>1</sub>HexNAc<sub>2</sub>HexNAc-ol at m/z 1024 isolated from wasp salivary mucins. MS/MS fragmentation patterns of parent ion 1024 from (A) subfraction **4.1** and (B) subfraction **4.2**.



**Figure 6:** MS/MS sequencing of permethylated glycans deHex<sub>1</sub>Hex<sub>2</sub>HexNAc<sub>1</sub>HexNAc-ol at m/z 1157 isolated from wasp salivary mucins. MS/MS fragmentation patterns of parent ion 1157 from (A) subfraction 5.2 and (B) subfraction 5.5.



**Figure 7:** (A) HPLC separation of alditol-oligosaccharides released from hornet salivary mucins. MALDI-TOF analyses of native fractions (B) 1, (C) 2, (D) 3 and (E) 8.



**Figure 8:** MS/MS sequencing of permethylated glycans isolated from hornet salivary mucins. MS/MS fragmentation patterns of parent ions (A) 738 from fraction 2, (B) 912 from fraction 4, (C) 942 from fraction 6 and (D) 983 from fraction 5.

## Material and methods

### *Isolation of oligosaccharide–alditols*

Nests from wasp and hornet were pulverised and suspended (48 h at 4°C) in phosphate buffered saline (50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 150 mM KCl at pH 7) containing 0.8% β-mercaptoethanol. The extract was centrifuged and the supernatant repetitively dialysed against large volumes of water during 72 h at 4°C. The glycoprotein material was purified using Sepharose 6B column (100\*4 cm) equilibrated and eluted with 100 mM Tris–HCl buffer (pH 8.0).

The purified material (about 1 g) was submitted to reductive β-elimination for 72 h at 37 °C in 100 mM NaOH containing 1 M NaBH<sub>4</sub>. The reaction was stopped by the addition of DOWEX 50\*8 (25–50 mesh, H<sup>+</sup> form) at 4 °C until pH 6.5. After filtration on glass wool and evaporation to dryness, boric acid was eliminated by repetitive distillation as its methyl ester in the presence of methanol. The material was submitted to a cationic exchange chromatography on DOWEX 50\*2 (200–400 mesh, H<sup>+</sup> form) to remove residual peptides.

Sugar-containing fractions were purified on Bio-Gel P2 column (Bio-Rad), (150\*2.5 cm). Finally, oligosaccharide–alditols were fractionated on DOWEX 1\*2 column (mesh 200–400, HCOO<sup>-</sup> form). Oligosaccharide-alditols were desorbed with water and pH was adjusted to 7 with sodium hydroxide.

### *Separation of oligosaccharide–alditols*

Compounds eluted with water were purified by HPLC. First step separation was performed on a primary amine-bounded silica column (Supelcosyl™, LC-NH<sub>2</sub>, 4.6 mm · 250 mm, Supelco Inc., Bellefonte, PA, USA) using a gradient of ACN–water and flow rate of 1 mL/min. For wasp's material, each purified compound was submitted to a second HPLC separation on a C18 column (C18 Hypersyl gold, 250x4,6 mm, 5µm, Thermo Electron Corporation) using a gradient of ACN/water 0,1% TFA and flow rate of 0,8 mL/min. Oligosaccharide–alditols were detected by UV spectroscopy at 206 nm.

### *Chemical modifications of oligosaccharide-alditols: Permethylation*

All glycan samples were permethylated using the NaOH/dimethyl sulfoxide method of Ciucanu and Kerek (1984). Briefly, compounds were incubated 2 hours in a suspension of NaOH in dry dimethylsulfoxide (400µl) and iodomethane (200 µl). The methylated products were extracted in chloroform and washed with water.



### ***Mass spectrometry analyses***

After first step HPLC purification, native oligosaccharides-alditols were reconstituted in water and analysed by mass spectrometry on a LCQ DK XP+ ion trap (Thermo Finnigan) instrument. Those were mixed with an equal volume of MeOH–0.1 % aqueous formic acid.

Permethylated samples were reconstituted in MeOH and then mixed to obtain the following concentration: MeOH/H<sub>2</sub>O 0,1% formic acid (80:20). Both samples were then infused directly at 50 nL/min using the nanoflow probe option for MS and MS<sup>n</sup> analyses. After second HPLC step, compounds were analysed as permethylated glycans on a Q-TOF Ultima MALDI Mass Spectrometer, Micromass. Samples were solubilised in ACN, premixed with DHB matrix (10mg/ml in ACN/H<sub>2</sub>O 0,1% TFA (20:80)) and then spotted.

### ***NMR analysis***

NMR spectra were acquired on a Bruker ASX 600 NB spectrometer equipped with double resonance (<sup>1</sup>H/X) broadband inverse z-gradient probe head (<sup>1</sup>H at 600.33 MHz). Before analysis, samples were treated twice with <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O (99.97% <sup>2</sup>H atoms, Euriso-top, CEA, Saclay, France) and then dissolved in 250 μL of <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O in Shigemi tubes (Shigemi Inc., Alison Park, United States). <sup>1</sup>H chemical shifts were expressed in parts per million (ppm) related to the methyl signal of acetone as internal standard (δH 2.225). All delays and pulses were performed for each one- and two-dimensional experiment. <sup>2</sup>D experiments were carried out using standard Bruker pulse program.

### ***Monosaccharide composition***

The monosaccharide composition analysis was performed according to Zanetta *et al.*, after acid-catalysed methanolysis and analysis of the liberated O-methyl-glycosides as heptafluorobutyrate derivatives. The volatile derivatives were separated by gas chromatography on a Carlo Erba GC 8000 chromatograph equipped with a 25 mm\*0.25 mm CP-Sil5 CB Low bleed/MS capillary column, 0.25 μm film phase (Chrompack France, Les Ulis, France) coupled to a Finigan Automass II mass spectrometer.

## References

- Ciucanu I, Kerek F (1984) *Carbohyd. Res.* 131: 209.
- Hård K., Van Doorn J.M., Thomas-Oates J.E., Kamerling J.P., Van Der Horst D.J. (1993) *Biochemistry* 32: 766-775.
- Haslam SM, Reason AJ, Morris HR, Dell A (1994) *Glycobiology* 4(2):105-6.
- Helling F, Dennis RD, Weske B, Nores G, Peter-Katalinic J, Dabrowski U, Egge H, Wiegandt H (1991) *Eur J Biochem* 200(2):409-21.
- Koles K, Irvine KD, Panin VM (2004) *J Biol Chem* 279, 4346-57..
- Koles K, Lim JM, Aoki K, Porterfield M, Tiemeyer M, Wells L, Panin V (2007) *Glycobiology*. 2007 Sep 23.
- Kramerov AA, Arbatsky NP, Rozovsky YM, Mikhaleva EA, Poleskaya OO, Gvozdev VA, Shibaev VN (1996) *FEBS Lett.* 378(3):213-8.
- Lopez M, Tetaert D, Juliant S, Gazon M, Cerutti M, Verbert A, Delannoy P. (1999) *Biochim Biophys Acta.* 1427(1):49-61.
- Maes E, Florea D, Coppin A, Strecker G (1999) *Eur J Biochem* 264(2):301-13.
- Maes E, Garenaux E, Strecker G, Leroy Y, Wieruszeski JM, Brassart C, Guerardel Y (2005) *Carbohydrate research* 340: 1852-1858.
- Martensson S, Lavery SB, Fang TT, Bendiak B (1998) *Eur J Biochem* 258(2):603-22.
- North SJ, Koles K, Hembd C, Morris HR, Dell A, Panin VM, Haslam VS (2006) *Glycoconj J* 23:345–354.
- Rendic D, Klaudiny J, Stemmer U, Schmidt J, Paschinger K, Wilson IB. (2007) *Biochem J.* 402(1):105-15.
- Roth J, Kempf A, Reuter G, Schauer R, Gehring WJ (1992) Science 256(5057):673-5.*
- Seppo A, Tiemeyer M (2000) *Glycobiology* 10(8):751-60. Review.
- Seppo A, Moreland M, Schweingruber H, Tiemeyer M (2000) *Eur J Biochem* 267(12):3549-58.
- Thomsen DR, Post LE, Elhammer AP (1990) *J Cell Biochem.* 43(1):67-79.
- Villemant, C. (2005) *Insectes* n° 136, 23-25.
- Wieruszeski JM, Michalski JC, Montreuil J, Strecker G, Peter-Katalinic J, Egge H, van Halbeek H, Mutsaers JH, Vliegthart JF. (1987) *J Biol Chem.* 262(14):6650-7.
- Zanetta, J.P., Timmerman, P., and Leroy, Y. (1999) *Glycobiology* 9: 255–266.

### **III - Seconds travaux : Nouvelle méthode de purification d'oligosaccharides sulfatés.**

#### **1. Introduction**

Les structures O-glycanniques sulfatées jouent un rôle primordial au sein des mucus recouvrant les épithélia. En effet, ces structures permettent l'acidification des mucines, définissent leurs propriétés rhéologiques ainsi que leur capacité d'interactions avec d'autres molécules. En outre, l'apparition ou la surexpression de motifs oligosaccharidiques sulfatés est souvent liée à des pathologies particulières telles que les cancers ou la mucoviscidose.

La caractérisation de ces oligosaccharides sulfatés, parfois minoritaires, au sein d'un mélange comprenant également des structures neutres ou sialylées se révèle ardue. Ainsi, il est idéalement plus avantageux de séparer les composés sulfatés des autres populations glycanniques afin d'optimiser leur analyse. Toutefois, l'acidité et de la labilité du groupement sulfate complique la purification de ces produits sulfatés. Si la méthode décrite par Karlsson et collaborateurs (Karlsson *et al.*, 1995) permet de séparer des oligosaccharides neutres, sulfatés et sialylés, elle implique une modification chimique irréversible des composés sialylés, nécessitant l'utilisation de composés chimiques dangereux, en concentrations incompatibles avec la purification de grande quantité d'oligosaccharides.

L'accès à différentes sources de mucines sulfatées nous a permis de mettre au point une technique de purification de structures O-glycanniques sulfatées extrêmement rapide et très simple, ne compromettant pas l'intégrité des monosaccharides présents. Notre méthode est à la fois compatible avec l'isolement de grande quantité d'oligosaccharides, dans le cas d'études systématiques des mucines d'amphibiens mais surtout compatible avec les faibles quantités d'échantillons disponibles dans le cas de prélèvements de tissus pathologiques humains.

#### **2. Résultats**

##### ***2.1 Méthode simplifiée de purification d'oligosaccharides sulfatés***

Le manuscrit suivant, intitulé *A single step method for purification of sulfated oligosaccharides* résume les travaux effectués sur les mucines sulfatées de différents organismes (mucines oviductales des amphibiens *Rana temporaria* et *Pleurodeles walt* et mucines trachéobronchiales humaines), validant notre méthode.

## A single step method for purification of sulphated oligosaccharides

Garenaux, E.<sup>1</sup>; Yu, S.Y.<sup>2</sup>; Florea, D.<sup>1</sup>; Strecker, G.<sup>1</sup>; Khoo, K.H.<sup>2</sup> and Guérardel Y.<sup>1</sup>

[1]Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UMR 8576 CNRS, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655, Villeneuve d'Ascq cedex, France

[2] Institute of Biochemical Sciences, National Taiwan University, Taipei, 106, Taiwan.

Keywords: Cation exchange, Mass spectrometry, Sulphated oligosaccharides, mucins

◇-ol	GalNAc-ol	◊	βGalNAc
●	βGlcNAc	◇	αGalNAc
■	βGal	⊙	αKdn
□	αFuc	⊗	βGlcUA
▲	αNeuAc	■	αGal
◐	αGlcNAc		

### Abstract

Purifying and analysing sulfated oligosaccharides by mass spectrometry often constitutes a challenge due to the acidity and lability of the sulfate groups. We present here a single step method to isolate sulfated compounds from a complex mixture of neutral and acidic oligosaccharide-alditols. The strategy relies on the exclusion of sulphated molecules from strong cation exchange resin. Testing a wide range of mucin type O-glycan mixture isolated from different biological sources by reductive β-elimination, we demonstrate that this method permits without prior chemical modification to specifically purify sulphate containing oligosaccharides present in any quantity from very complex mixtures of molecules.

## 1. Introduction

Sulphation is a common modification of protein glycans. It is known to be present at a very high prevalence on high molecular weight glycosaminoglycans bearing proteoglycans whose physico-chemical and biological functions are directly dependent on their number and positions. It is also incorporated in numerous smaller protein glycans where it may play a crucial role in biological functions of glycoproteins. In human, it mainly substitutes lactosamine-containing glycans either as GlcNAc-6-sulfate and Gal-3-Sulfate (Degroote *et al.*, 1999, 2003; Lamblin *et al.*, 2001). Sulphate groups are observed in N-glycans substituted proteins such as thyroglobulin (Spiro and Bhojroo, 1988), carbonic anhydrase VI (Hooper *et al.*, 1995) or Tamm-Horsfall (Hard *et al.*, 1992), as well as O-glycans in ovarian cystadenoma glycoproteins (Yuen *et al.*, 1992). Unusual sulphations may also occur on very specific epitopes such as HNK1 (SO<sub>4</sub>-3-GlcAβ1,4Galβ1,4G1cNAc-R) on myelin-associated glycoproteins. Several glycoconjugates have been shown to play important biological roles mediated by specific recognition of their sulphate moiety by receptors. This is the case of luteinizing hormone receptor on endothelial cells that is highly specific for the SO<sub>4</sub>-4-GalNAc1,4G1cNAc motifs present on its N-glycans and is responsible for the rapid clearance of the hormone from circulation (Fiete *et al.*, 1991). Similarly, the oligosaccharide ligand for L-selectin was shown to be the 6' sulfo-sialyl Le<sup>x</sup> on a mucin-like molecule, termed GIyCAM-1 (for glycosylated cell adhesion molecule-1), during the homing of leukocytes to sites of inflammation (Hemmerich *et al.*, 1995).

However, aside proteoglycans, mucin type glycoproteins are the main carriers of sulphated glycans in humans. Mucins are the major protein component of the mucus protecting the epithelia. They are highly glycosylated macromolecules characterized by the presence of a dense and highly diverse O-glycosylation, linked to the protein core through serines and threonines, that may represent up to 80% of the total weight of mucins. O-glycans contribute to both the physical and chemical protections of sensitive epithelia, such as airways epithelia, by providing the rheologic properties of mucus. Furthermore the extraordinary structural diversity of O-glycosylation generate a wide range of carbohydrate based epitopes that are believed to supply attachment sites for microorganisms, which can be trapped and expelled during the continuous renewal of the mucus layer. By providing competing receptors for cell-surface glycoconjugates, mucins may trap bacteria and make them less successful in their attempts to colonize the epithelium. Thus, the array of oligosaccharides expressed on the mucins of an individual may play a key role in governing the susceptibility to infection

(Thornton and Sheehan, 2004). In human, sulphate groups have been observed in most excreted mucin-containing mucus, including salivary (Thomsson *et al.*, 2005), tracheo bronchial (Lo-Guidice *et al.*, 1994) and intestinal mucus (Robbe *et al.*, 2003).

In pathological conditions, sulfation status of mucin type O-glycosylation, among other modifications of glycosylation patterns, may be modified. Such modifications occur during numerous pathologies affecting airways such as cystic fibrosis or chronic bronchitis. Indeed, it was reported that airway mucins prepared from patients suffering from CF or from severe chronic bronchitis, infected by *Pseudomonas aeruginosa* are more sulphated and even more sialylated than mucins secreted by less infected patients suffering from chronic bronchitis (Davril *et al.*, 1999). It was suggested that both oversulfation and strong inflammatory reaction, generating an increase in mucin sialylation and an hyperexpression of sialyl-Lex, may be responsible for the specific lung colonization by *P. aeruginosa* of CF patients. Indeed, the use of purified sulphated O-glycans coupled to synthetic polymers gave good lines of evidences to directly correlate the increased sulfation of CF mucins and the increased affinity of *P. aeruginosae* to CF mucus (Scharfman *et al.*, 2000). Accordingly, the flagellar cap protein, FliD, from PAO1 strain demonstrated a clear association with sulfosialyl-Lewis x, as well as with other Lewis x derivatives (Scharfman *et al.*, 2001).

Structural analysis of sulphated compounds is impaired by the difficulty to purify them from complex mixtures of mucin-type O-glycans. Indeed, anion exchange chromatography cannot easily discriminate sulphated compounds from other acidic compounds such as sialic acid and uronic acid containing O-glycans, which renders subsequent analyses by chromatographic or spectroscopic methods difficult. An elegant method for separating sialylated from sulphated mucin type O-glycans in mixture based on on-column carboxy-methylation of sialic acids was previously proposed (Karlsson *et al.*, 1995). The conversion of sialic acids to methyl esters after collection of neutral glycans permitted to elute them from anion exchanger independently of the sulphated compounds. Although very efficient, this method involves the chemical modification of sialic acids which are then lost for eventual use for biological tests. Furthermore, the necessity to use fairly large amounts of harmful iodomethane and high concentration of pyridinium acetate for elution of sulphated oligosaccharides, is not compatible with possible large scale purification of sulphated glycans from natural sources. Here we propose an alternative procedure aimed to purifying intact sulphated oligosaccharides in batch from complex mixtures of neutral and acidic O-linked glycans. It is based on the charge repulsiveness between sulphate groups of carbohydrates and

strong cation exchanger gel and enables an easy one step purification of all sulphate containing glycans.

## **2. Results and discussion**

### ***2.1. Purification of sulphated compounds***

#### ***2.1.1. Principle***

*O*-linked oligosaccharides alditols were released from several biological sources by reductive  $\beta$ -elimination. Borates were co-distilled with methanol and samples successively passed over 50x8 cation exchange column in order to remove remaining salts. Remaining peptides were eliminated by a passage over 50x2 cation exchange column. Columns were eluted with five column volumes of water and total eluate was freeze-dried. Care was taken to immediately neutralize samples with diluted ammonia after cation exchange chromatographies to protect sialic acids from acid hydrolysis.

Three samples were used in the course of the present study; two egg-jelly mucus from the amphibians *Rana temporaria* and *Pleurodeles walt* and a sample of human tracheo-bronchial mucus. Oligosaccharides from amphibians have been extensively characterized so their glycosylation profiles are already well known and can be used to evaluate the effectiveness of the separation methodology. Total oligosaccharide samples were directly loaded onto a 50x2 (200-400 mesh H<sup>+</sup> form) without prior desalting and eluted with water. Column size was adapted depending on the total quantity of carbohydrate for each sample that ranged from about 200 mg for *Rana temporaria* to less than 100  $\mu$ g for tracheo bronchial *O*-glycans.

#### ***2.1.2. O-glycans from Rana temporaria***

About two hundred mgs of *O*-linked oligosaccharides were released and purified from one gram of dried egg jelly coat of the amphibian *Rana temporaria*. This species synthesises a very complex mixture of neutral and acidic *O*-glycans (<http://glycobase.univ-lille1.fr/>). Acidic properties are conferred by the presence of either sulphate groups, sialic acid (Kdn) or glucuronic acid (GlcA) substituents. Some acidic components may be substituted by two different acidic groups. Sheer complexity of this sample appeared as ideal for assessing the selectivity of separation on cation exchange chromatography of different acidic compounds.

Total glycan sample was loaded on a Dowex 50x2 column (200–400 mesh, H<sup>+</sup> form) (150x2.5 cm) irrigated with water at 0.2 ml/min and collected as 2 ml fractions. Considering the large quantity of carbohydrates, the elution of carbohydrate was monitored by phenol-sulphuric colorimetric reaction after migration of all fractions on Thin Layer Chromatography

(TLC). This visual method allowed an easy discrimination of different oligosaccharidic fractions according to their migration. As shown on [Figure 1](#), a carbohydrate rich fraction was first excluded from the column in tubes 37 to 42, which correspond to the dead volume of the column. This excluded material exhibited a very heterogeneous pattern of migration on TLC, establishing that it is composed of a complex mixture of oligosaccharides of different sizes. Then, retarded carbohydrates were eluted from tube 43 onward. Orcinol positive fractions (tubes 43 to 76) were all pooled as a single included fraction for analysis. Excluded and included material show very distinct chromatographic patterns establishing that both fractions essentially contain different oligosaccharides.

The oligosaccharide content of each fraction was screened by MALDI-TOF MS in both positive and negative modes. Monosaccharide compositions of individual signals were calculated according to the observed  $m/z$  values and the nature of each compound was inferred from previously described oligosaccharides isolated from *Rana temporaria* egg jelly coat (Maes *et al.*, 1997; Florea *et al.*, 1997; Coppin *et al.*, 1999; unpublished results) and confirmed by ES-MS/MS fragmentation of most oligosaccharides (data not shown). As expected, MS profiles in positive mode of excluded and included fractions are very different ([Figure 1](#)). Included fraction is characterized by a complex pattern of  $[M+Na]^+$  signals attributed to neutral and acidic oligosaccharides as presented on [Table 1](#). Identification of these oligosaccharides established that the acidic glycans are substituted either by Kdn or by GlcA, but never by sulphate group. Contrarily, the profile of excluded fraction was characterized by the presence of  $[M+2Na-H]^-$  signals attributed to the sulphate containing oligosaccharides previously described in *Rana temporaria* jelly coat. This attribution was confirmed by acquiring MS spectrum in negative mode, which produced a series of  $[M-H]^-$  ions of identical composition than their  $[M+2Na-H]^-$  counterparts. It is noteworthy that none of the signals attributed to sulphated glycans could be observed in the included fraction. Positive mode MS spectrum of excluded fraction additionally shows numerous  $[M+Na]^+$  ions attributed to non sulphated oligosaccharides that have been already observed in the included fraction. As it will be demonstrated in [Chapter 2](#), these ions result from a laser induced desulfation process. Indeed, most of the  $[M+2Na-H]^-$  major signals produced a  $[M-80+Na]^+$  signal at  $m/z$  -102 (e.g. 672/570; 818/716; 859/757; 980/878) resulting from the loss of a sulphate group.

These data demonstrated that strong cation exchange chromatography enables a complete exclusion of sulphate containing oligosaccharides from the column. We hypothesise that repulsion forces between sulphate groups substituting the oligosaccharides and sulfonic



acid functional groups attached to the styrene divinylbenzene resin prevent sulphated glycans to penetrate copolymer lattice and exclude them from the column, contrarily to other glycans which are retarded in the polymer. Optimal separation between excluded and included fractions are obtained when using highest porosity (2% crosslinkage) and lowest particle size (200-400 mesh) resin, which maximizes the retardation of included fraction. So, Dowex 50x2 (Sigma-Aldrich) and AG 50x2 200x400 mesh (Bio-Rad) appeared as the most fitted resins. The presence of non sulphated GlcA and Kdn containing oligosaccharides in the included fraction established that carboxylated functions are not excluded from the resin, which permits an easy separation between acidic oligosaccharides exclusively based on the presence of sulphate groups.

### ***2.1.3. O-glycans from *Pleurodeles waltl****

In a second step we assessed the usefulness of the described method for purifying minute amounts of sulphated oligosaccharides from very complex mixture of non sulphated glycans. Contrarily to the amphibian *Rana temporaria* that synthesises large amounts of sulphated oligosaccharides, oviducal mucins of *Pleurodeles waltl* are exclusively substituted by neutral and sialylated oligosaccharides, as previously established (Strecker1992; Strecker 1992). However, careful re-evaluation of the oligosaccharidic content of *P. waltl* permitted to isolate by multidimensional HPLC a single sulphated glycans as minor component, establishing the presence of small amount of sulphate substitutions (unpublished data).

Total *O*-glycans released by reductive  $\beta$ -elimination from 200 mgs of *P. waltl* were separated on a Dowex 50x2 column (200–400 mesh,  $H^+$  form) (50x2 cm) in similar conditions that above and collected as 2 mL fractions. Elution profile of oligosaccharides was directly assessed by MALDI-TOF MS analysis of each eluted fraction. As shown in Table 2, three oligosaccharides observed as signals at  $m/z$  656, 1370 and 1516 are clearly excluded from the cation exchange column in fractions 26 to 34, whereas most other compounds are eluted from fraction 34 to fraction 45. Excluded signals at  $m/z$  656, 1370 and 1516 were attributed to  $[M+2Na-H]^+$  adducts of  $HSO_3dHex_1Hex_1HexNAC_1-ol$ ,  $SO_4deHex_2Hex_2HexNAC_3-ol$  and  $HSO_3dHex_3Hex_2HexNAC_3$ , respectively.  $^1H$  NMR analysis of the pooled excluded fraction (data not shown) established the exact structure of it's major component as a core 1 based sulphated trisaccharide  $Fuc(\alpha 1-2)[HSO_3(1-4)]Gal(\beta 1-3)GalNAC-ol$ , in agreement the presence of signal at  $m/z$  656 in MS analysis. Signals at  $m/z$  1370 and 1516 were identified as very minor components whose structures were tentatively assigned to sulphated trisaccharide extended from  $GalNAC-ol$  C6 with  $Fuc(\alpha 1-2)GalNAC(\beta 1-4)GlcNAC(\beta 1-$  and  $Fuc(\alpha 1-$

2)GalNAc( $\beta$ 1-4)[Fuc( $\alpha$ 1-3)]GlcNAc( $\beta$ 1- branches, respectively. It is noteworthy that all sulphated oligosaccharides are excluded in the same fractions, irrespective of their molecular weights. Signals observed in included fractions were all attributed to  $[M+Na]^+$  adducts of neutral and sialylated oligosaccharides whose structures were assigned based on previous work (Strecker 1992 a and b; unpublished work) and in accordance with their calculated compositions. Contrarily to sulphated compounds, the elution volumes of included compounds are dependent on their molecular weight, which demonstrates that cation exchanger resin acts as a molecular sieve for neutral and sialylated oligosaccharides.

We demonstrated here that cation exchange chromatography is useful for purifying minor sulphated oligosaccharides among a complex mixture of non-sulfated compounds.

#### **2.1.4. Human tracheobronchial mucins**

In a last step, we validated the method by analysing minute amounts of oligosaccharides isolated from human tracheobronchial mucins. Less than 100  $\mu$ g of reduced *O*-glycans released from purified tracheobronchial mucins by reductive  $\beta$ -elimination were loaded on 150  $\mu$ l of DOWEX 50x2 resin (200–400 mesh,  $H^+$  form) packed in a 200  $\mu$ L automatic pipette cone. Column was eluted with water and 25  $\mu$ L fractions were collected. Elution of sulphated oligosaccharides was monitored by dosing sulphate concentration on an IonPac AS4A column fitted on a Dionex BioLC system. As expected, sulphate concentration is maximal in fractions 3, 4 and 5, which correspond to the dead volume of the column (Figure 3). As observed by MALDI-TOF-MS, sulphate containing fractions are composed of a very complex mixture of almost exclusively sulphated oligosaccharides (Table 3). No neutral oligosaccharide was detected in sulphate containing fractions, but two minor sialylated oligosaccharides were observed (Table 3). Despite the low bed volume of resin, sulphated and non sulphated molecules were well unexpectedly well resolved. Oligosaccharides were detected up to fraction 12 that is completely devoid of sulphated oligosaccharides and exclusively composed of neutral compounds (Table 3).

Presented data establish the use of strong cation exchange resin as a reliable method for specifically purifying sulphated oligosaccharides from a very complex mixture of neutral, sialylated and sulphate component, exclusively based on the presence of sulphate groups. It is selective enough to extract very minor sulphated oligosaccharides. Furthermore, this method may be adapted for any quantity of purified glycans from the microgram scale up to at least the hundreds of milligram. Indeed, we demonstrated that it may be used for large scale purification simply by adapting bed resin size, collection and detection procedures. It does not

require any chemical modification of oligosaccharides of interest and thus can be used in the context of analysis of biologically relevant molecules. Furthermore, contrarily to classical protocols of purification of acidic oligosaccharides based on anion exchange chromatography, sulphated molecules are eluted in salt free conditions, which permit to omit a tricky desalting step.

## **2.2. Analysis of sulphated glycans by MALDI-MS/MS**

As already mentioned, sulphated oligosaccharides crystallized in DHB matrix are observed as  $[M+2Na-H]^+$  adducts in positive mode MALDI-TOF MS spectra. Indeed, detail of the spectrum of sulphated fraction of human bronchial *O*-glycans show five signals at  $m/z$  859, 875, 916, 1005 and 1021 corresponding to  $[M+2Na-H]^+$  adducts of sulphated oligosaccharides (Figure 4B). Their attribution was confirmed by observing their  $[M-H]^-$  adducts at  $m/z$  813, 829, 870, 959 and 975 in negative mode (Figure 4C). Furthermore, a set of  $[M+Na]^+$  adducts ( $m/z$  at 773, 814, 903, 919, 960 and 976) is clearly observed in positive mode (Figure 4B), which calculated compositions fit to neutral equivalents of all sulphated oligosaccharides at  $m/z$  -102. All these signals were also observed in the neutral fraction of *O*-glycans (Figure 4A), which suggests that they originate either from a contamination of the sulphated fraction by neutral oligosaccharides or from a partial desulphation of oligosaccharides during MALDI-TOF analysis. Positive mode MALDI-TOF analysis of sulphated fraction permethylated derivatives showed an identical set of sulphated oligosaccharides as  $[M+2Na-H]^+$  adducts ( $m/z$  1041, 1071, 1112, 1245 and 1286) than native oligosaccharides (Figure 4D). A set of accompanying  $[M+Na]^+$  adducts at  $m/z$  - 102 (939, 969, 1010, 1143 and 1184) are also observed. Their  $m/z$  values correspond to the neutral equivalents of permethylated sulphated oligosaccharides in which a  $-CH_3$  group has been replaced by a hydroxyl group, demonstrating that neutral oligosaccharides originate from an on target desulphation process and not from genuine unsulphated molecules.

Observation of different sets of  $[M+Na]^+$  and  $[M+2Na-H]^+$  adducts enables an easy distinction of sulphated and non sulphated components in positive mode MALDI-TOF MS spectra. This principle can be extended to MS/MS analyses of sulphated oligosaccharides that generate both  $[M+Na]^+$  and  $[M+2Na-H]^+$  adducts in a single fragmentation spectrum depending on the presence of sulphate group in the fragments. Indeed, as shown in the MS/MS fragmentation patterns of sulphated oligosaccharides (Figure 6A), sulphated fragments are all characterized by specific  $[M+2Na-H]^+$  adducts. As an example, fragmentation of parent ion at  $m/z$  1021 established the presence of two distinct isobaric Lewis x containing core 2 *O*-glycans  $HSO_3Gal_2GlcNAc_1GalNAc-ol$  only differing by the

position of sulphate group. Although many neutral fragments are observed on the spectra, we believe that they do not originate from a secondary fragmentation induced desulphation, as demonstrated by the total absence of ion at  $m/z$  773 potentially resulting from desulphation of primary fragment at  $m/z$  875. This particular ion is however clearly observed in the fragmentation pattern of the parent ion at  $m/z$  919 that originates from the primary on target desulphation of the sulphated oligosaccharide. Then, comparison of the fragmentation spectra of the permethylated derivatives of  $\text{HSO}_3\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_1\text{GalNAc-ol}$  at  $m/z$  1245 with its desulphation product at  $m/z$  1143 confirmed that all sulphate containing  $[\text{M}+2\text{Na}-\text{H}]^+$  fragments are replaced by hydroxylated  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  fragments. Fragmentation of permethylated derivatives also confirmed the absence of desulfation during collision induced fragmentation.

**Table 1:** Assignment of major oligosaccharides released from *Rana temporaria* mucins observed in (A) excluded fraction by positive and negative modes MALDI-TOF MS and (B) included fraction by positive mode MALDI-TOF MS.

(A) Excluded fraction.

$[M+2Na-H]^+$ $m/z$	$[M-H]^-$ $m/z$	Assignment	Symbol
672.1	626.0	S Hex <sub>2</sub> HexNAc-ol	
713.2	667.0	S HexNAc Hex HexNAc-ol	
760.2	714.0	S Kdn Hex HexNAc-ol	
818.2	772.0	S dHex Hex <sub>2</sub> HexNAc-ol	
848.2	802.0	S GlcUA Hex <sub>2</sub> -HexNAc-ol	
859.2	813.0	S dHex HexNAc Hex HexNAc-ol	
875.2	829.0	S HexNAc Hex <sub>2</sub> HexNAc-ol	
980.2	934.0	S dHex Hex <sub>3</sub> HexNAc-ol	
	948.0	S dHex GlcUA Hex <sub>2</sub> -HexNAc-ol	
1021.2	975.0	S dHex HexNAcHex <sub>2</sub> HexNAc-ol	
1037.3		S HexNAc Hex <sub>3</sub> HexNAc-ol	
1126.3	1080.0	S dHex <sub>2</sub> Hex <sub>3</sub> HexNAc-ol	
1167.3	1121.1	S dHex <sub>2</sub> HexNAc Hex <sub>2</sub> HexNAc-ol	
1183.4		S dHex HexNAc Hex <sub>3</sub> HexNAc-ol	

1224.4	1178.0	S dHex HexNac <sub>2</sub> Hex <sub>2</sub> HexNac-ol	
1302.4	1256.0	S dHex <sub>2</sub> GlcUA Hex <sub>3</sub> HexNac- ol	
1313.5		S dHex <sub>3</sub> HexNac <sub>2</sub> Hex <sub>4</sub> HexNac-ol	

*Abbreviations: GlcUA: glucuronic acid*

(B) Included fraction

$[M+Na]^+$ $m/z$	Assignment	Detailed formula
554	dHex Hex HexNAc-ol	
570	Hex <sub>2</sub> -HexNAc-ol	
611	Hex HexNAc HexNAc-ol	
658	Kdn Hex HexNAc-ol	
716	dHex Hex <sub>2</sub> HexNAc-ol	
757	dHex HexNAc Hex HexNAc-ol	
862	dHex <sub>2</sub> Hex <sub>2</sub> HexNAc-ol	
878	dHexHex <sub>3</sub> -HexNAc-ol	
892	<i>dHexHexUAHex<sub>2</sub>-HexNAc-ol</i>	
919	dHexHex <sub>2</sub> HexNAc-HexNAc-ol	
960	dHexHexHexNAc <sub>2</sub> -HexNAc-ol	
1024	<i>dHex<sub>2</sub>Hex<sub>3</sub>-HexNAc-ol</i>	
1038	dHex <sub>2</sub> HexUAHex <sub>2</sub> -HexNAc-ol	
1054	<i>dHexHexUAHex<sub>3</sub>-HexNAc-ol</i>	
1170	dHex <sub>3</sub> Hex <sub>3</sub> -HexNAc-ol	

**Table 2:** Elution profile of oligosaccharide-alditols from *Pleurodeles walt* mucin after cationic exchange column Assessed by MALDI-TOF MS.

	$[M+2Na-H]^+$	$[M+Na]^+$	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
	656		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+									
	1370		+	+	+	+	+	+	+	+	+											
	1516		+	+	+	+	+	+	+	+												
	1356												+	+	+	+	+	+	+	+		
	1210												+	+	+	+	+	+	+	+		
	1153																	+	+			
	1106										+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
	960											+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	1007																		+	+	+	
	903														+	+	+	+	+	+	+	
	804															+	+					
	814														+	+		+	+	+	+	
	757															+	+	+	+	+	+	
	699																				+	+



**Table 3:** Assignment of major human tracheobronchial oligosaccharides observed in (A) an excluded fraction by negative mode MALDI-TOF MS and (B) an included fraction by positive mode MALDI-TOF MS

<i>(A) Fraction 3, negative mode [M-H]<sup>-</sup></i>	
Signal (m/z)	Assignment
813	(HSO3-)dHexHexNAcHex-HexNAc-ol
829	(HSO3-) HexNAc Hex <sub>2</sub> -HexNAc-ol
975	(HSO3-)dHexHexNAcHex <sub>2</sub> -HexNAc-ol
1040	NeuAc HexNAc Hex <sub>2</sub> HexNAc-ol
1121	(HSO3-)dHex <sub>2</sub> HexNAcHex <sub>2</sub> -HexNAc-ol
1137	(HSO3-)dHexHexNAcHex <sub>3</sub> -HexNAc-ol
1178	(HSO3-)dHexHexNAc <sub>2</sub> Hex <sub>2</sub> -HexNAc-ol
1186	NeuAc dHex HexNAc Hex HexNAc-ol
1283	(HSO3-)dHex <sub>2</sub> HexNAcHex <sub>3</sub> -HexNAc-ol
1340	(HSO3-)dHexHexNAc <sub>2</sub> Hex <sub>3</sub> -HexNAc-ol
1486	(HSO3-)dHex <sub>2</sub> HexNAc <sub>2</sub> Hex <sub>3</sub> -HexNAc-ol
1632	(HSO3-)dHex <sub>3</sub> HexNAc <sub>2</sub> Hex <sub>3</sub> -HexNAc-ol
1648	(HSO3-)dHex <sub>2</sub> HexNAc <sub>2</sub> Hex <sub>4</sub> -HexNAc-ol
1794	(HSO3-)dHex <sub>3</sub> HexNAc <sub>2</sub> Hex <sub>4</sub> -HexNAc-ol
1851	(HSO3-)dHex <sub>2</sub> HexNAc <sub>3</sub> Hex <sub>4</sub> -HexNAc-ol
1997	(HSO3-)dHex <sub>3</sub> HexNAc <sub>3</sub> Hex <sub>4</sub> -HexNAc-ol

<i>(B) Fraction 12, positive mode, m/z corresponding to [M+Na]<sup>+</sup></i>	
Signal (m/z)	Assignment
757	dHexHexNAcHex-HexNAc-ol
773	HexNAcHex <sub>2</sub> -HexNAc-ol
862	dHex <sub>2</sub> Hex <sub>2</sub> -HexNAc-ol
878	dHexHex <sub>3</sub> -HexNAc-ol
919	dHexHexNAcHex <sub>2</sub> -HexNAc-ol
935	HexNAcHex <sub>3</sub> -HexNAc-ol
976	HexNAc <sub>2</sub> Hex <sub>2</sub> -HexNAc-ol
1024	dHex <sub>2</sub> Hex <sub>3</sub> -HexNAc-ol
1065	dHex <sub>2</sub> HexNAcHex <sub>2</sub> -HexNAc-ol
1081	dHexHexNAcHex <sub>3</sub> -HexNAc-ol
1122	dHexHexNAc <sub>2</sub> Hex <sub>2</sub> -HexNAc-ol
1138	HexNAc <sub>2</sub> Hex <sub>3</sub> -HexNAc-ol
1211	dHex <sub>3</sub> HexNAc <sub>2</sub> Hex <sub>2</sub> -HexNAc-ol
1227	dHex <sub>2</sub> HexNAcHex <sub>3</sub> -HexNAc-ol
1243	dHexHexNAcHex <sub>4</sub> -HexNAc-ol
1284	dHexHexNAc <sub>2</sub> Hex <sub>3</sub> -HexNAc-ol
1373	dHex <sub>3</sub> HexNAcHex <sub>3</sub> -HexNAc-ol
1389	dHex <sub>2</sub> HexNAcHex <sub>4</sub> -HexNAc-ol
1430	dHex <sub>2</sub> HexNAc <sub>2</sub> Hex <sub>3</sub> -HexNAc-ol
1446	dHexHexNAcHex <sub>4</sub> -HexNAc-ol
1576	dHex <sub>3</sub> HexNAcHex <sub>3</sub> -HexNAc-ol
1592	dHex <sub>2</sub> HexNAcHex <sub>4</sub> -HexNAc-ol
1649	dHexHexNAc <sub>2</sub> Hex <sub>4</sub> -HexNAc-ol
1797	dHex <sub>2</sub> HexNAc <sub>2</sub> Hex <sub>4</sub> -HexNAc-ol

## Figures

**Figure 1:** Fractionation on a strong cation exchange chromatography column of total *O*-glycans released by reductive  $\beta$ -elimination from egg jelly coat of *Rana temporaria* eggs, monitored by TLC.

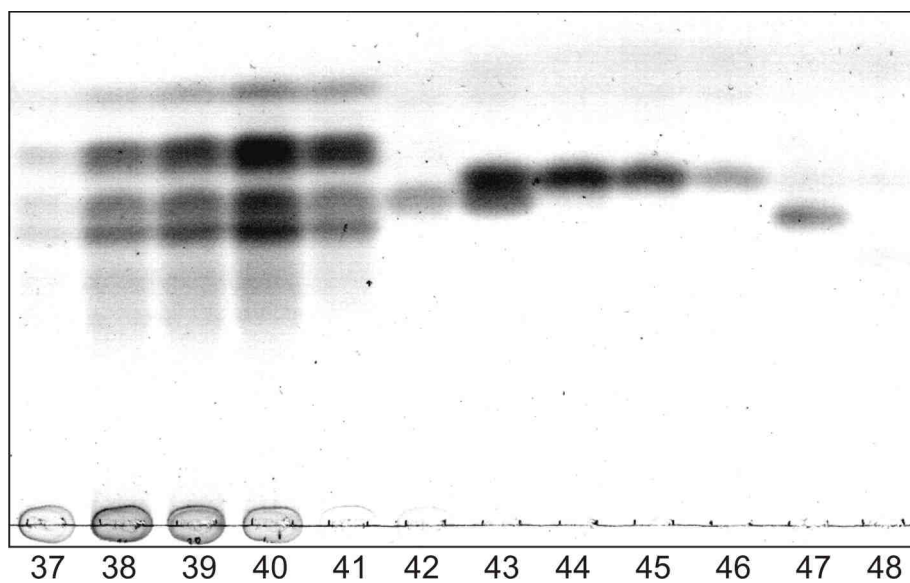
**Figure 2:** Mass spectrometry analysis of glycans from *Rana temporaria* released by reductive  $\beta$ -elimination. Positive reflectron mode MALDI-TOF spectrum of native (A) excluded fraction and (B) included fraction. Asterisks labelled  $m/z$  values correspond to  $[M+2Na-H]^+$  adducts of sulphated oligosaccharides, the others to  $[M+Na]^+$  adducts of desulfated neutral oligosaccharides (in A) or genuine neutral oligosaccharides (in B). (C) negative reflectron mode MALDI-TOF spectrum of native of excluded fraction. All  $m/z$  values correspond to  $[M-H]^-$  adducts of sulphated oligosaccharides.

**Figure 3:** Detection of sulfate groups after separation of oligosaccharides isolated from human tracheobronchial mucin on strong cation exchange chromatography.

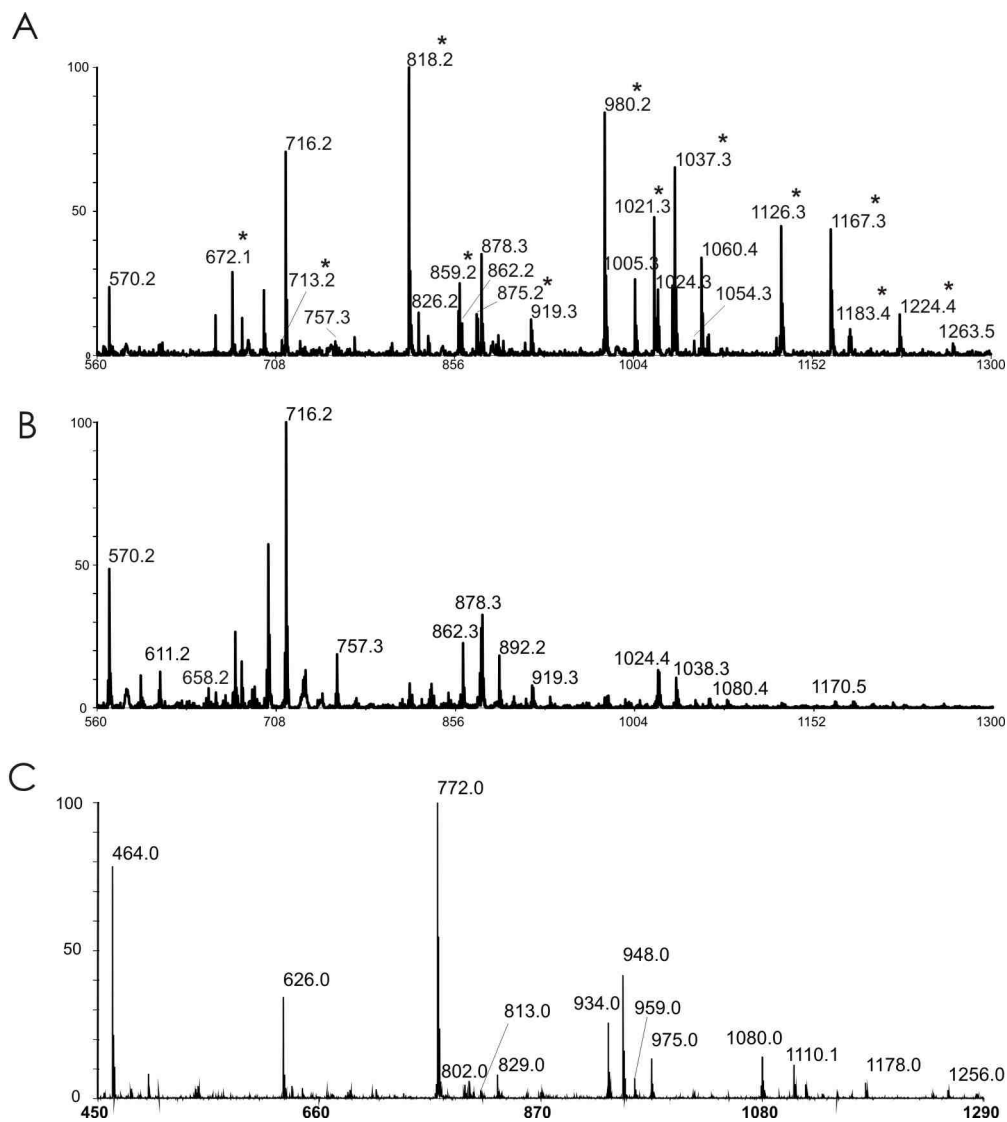
**Figure 4:** Details of spectrometry analysis of glycans from human bronchial mucins released by reductive  $\beta$ -elimination. Positive mode MALDI-TOF spectra of (A) native neutral fraction, (B) native sulphated fraction and (D) permethylated sulphated fraction. (C) Negative mode MALDI-TOF spectra of native sulphated fraction.

**Figure 5:** Collision induced MALDI-Q-TOF fragmentation spectra of (A)  $[M+2Na-H]^+$  parent ion at 1021 of sulphated oligosaccharide  $SO_3Gal_2GlcNAc_1GalNAc-ol$  and (B)  $[M+Na]^+$  parent ion at 919 of on target desulphated oligosaccharide  $Gal_2GlcNAc_1GalNAc-ol$  isolated from human bronchial mucin.

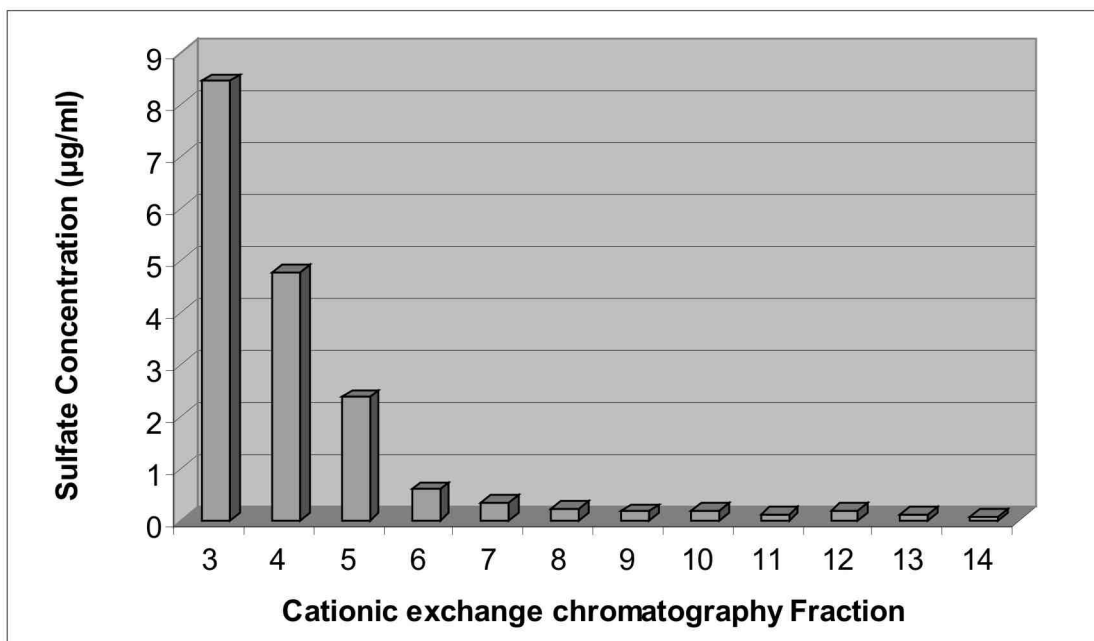
**Figure 6:** Collision induced MALDI-Q-TOF fragmentation spectra of (A)  $[M+2Na-H]^+$  parent ion at 1245 of sulphated oligosaccharide  $SO_3Gal_2GlcNAc_1GalNAc-ol$  permethylated derivative and (B)  $[M+Na]^+$  parent ion at 1143 of on target desulphated oligosaccharide  $Gal_2GlcNAc_1GalNAc-ol$  permethylated derivative isolated from human bronchial mucin.



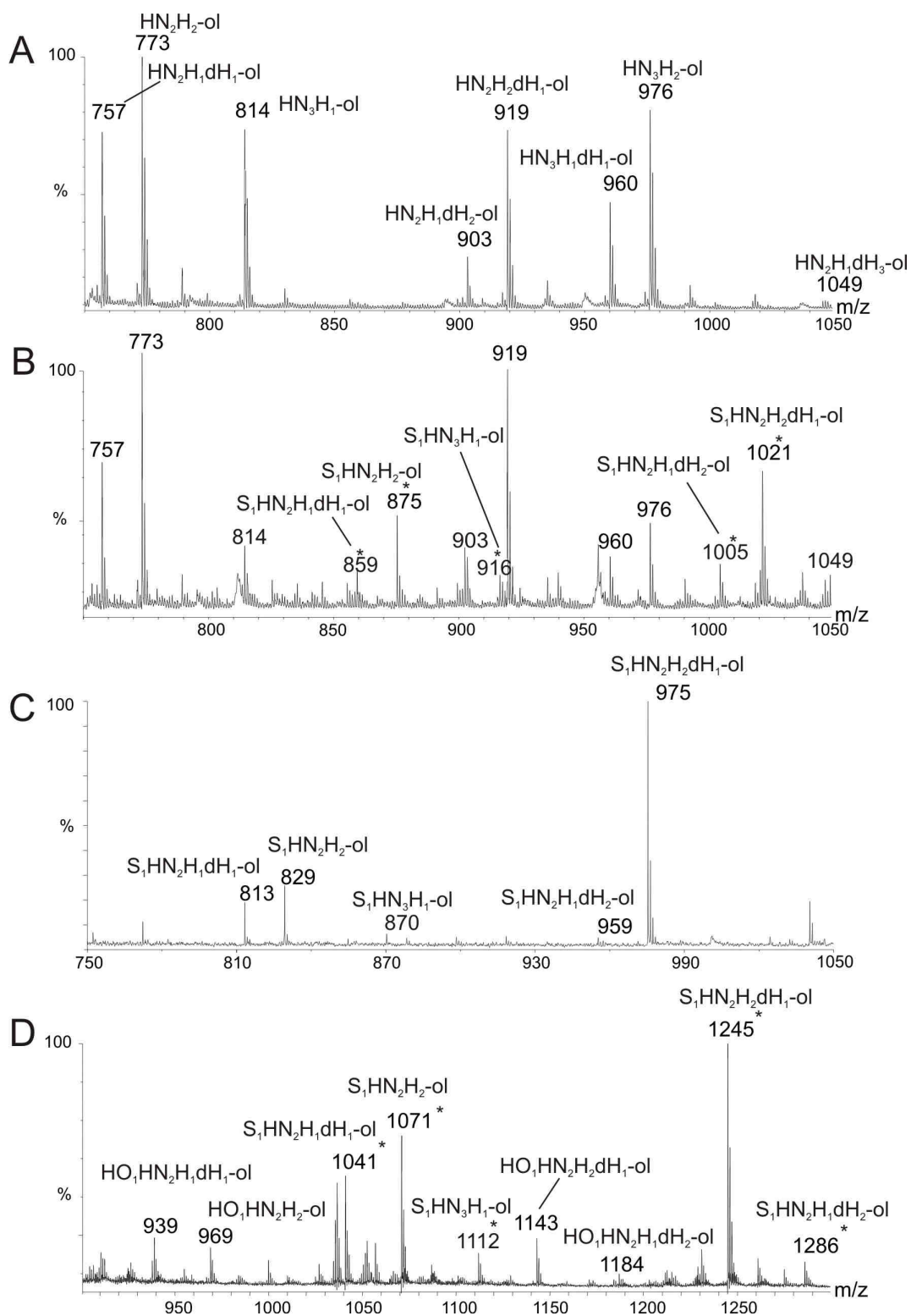
**Figure 1:** Fractionation on a strong cation exchange chromatography column of total *O*-glycans released by reductive  $\beta$ -elimination from egg jelly coat of *Rana temporaria* eggs, monitored by TLC.



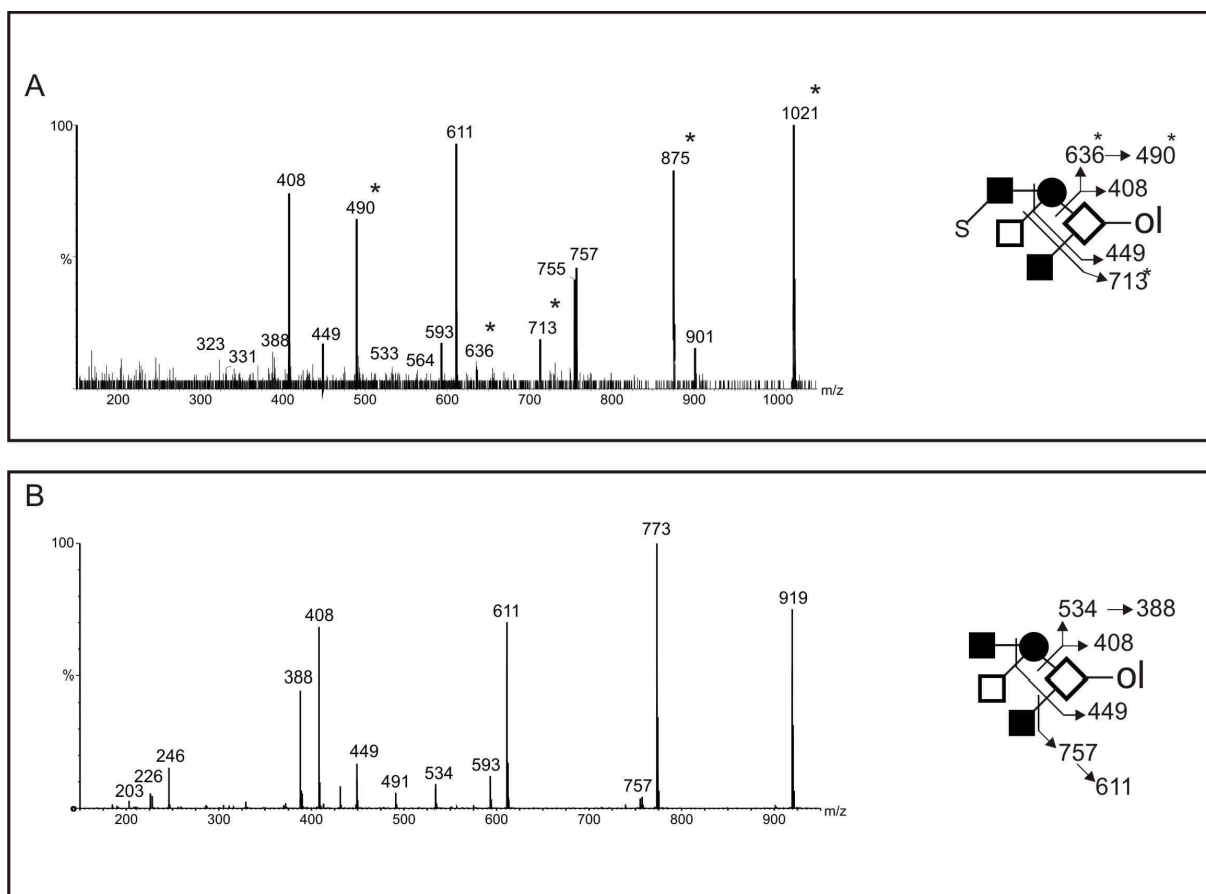
**Figure 2:** Mass spectrometry analysis of glycans from *Rana temporaria* released by reductive  $\beta$ -elimination. Positive reflectron mode MALDI-TOF spectrum of native (A) excluded fraction and (B) included fraction. Asterisks labelled m/z values correspond to  $[M+2Na-H]^+$  adducts of sulphated oligosaccharides, the others to  $[M+Na]^+$  adducts of desulfated neutral oligosaccharides (in A) or genuine neutral oligosaccharides (in B). (C) negative reflectron mode MALDI-TOF spectrum of native of excluded fraction. All m/z values correspond to  $[M-H]^-$  adducts of sulphated oligosaccharides.



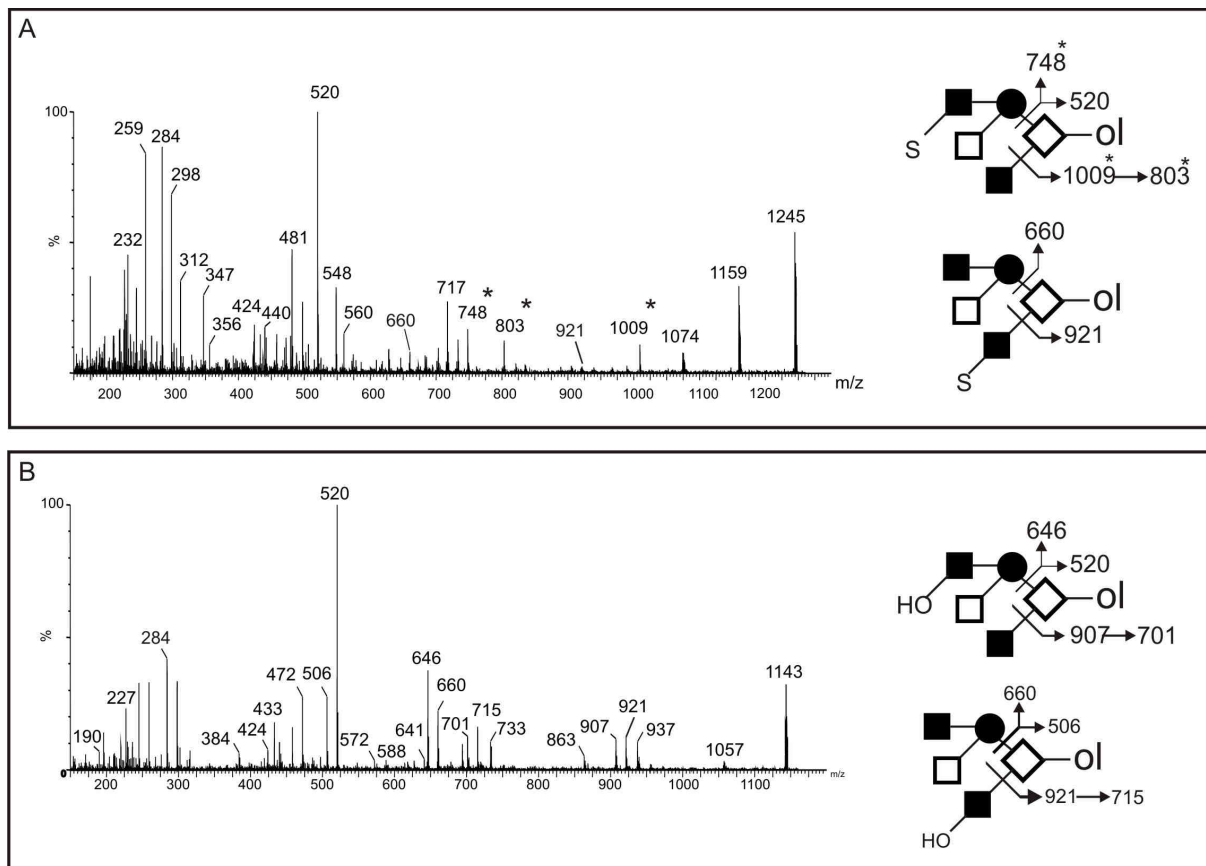
**Figure 3:** Detection of sulphate groups after separation of oligosaccharides isolated from human tracheobronchial mucin on strong cation exchange chromatography.



**Figure 4:** Details of spectrometry analysis of glycans from human bronchial mucins released by reductive  $\beta$ -elimination. Positive mode MALDI-TOF spectra of (A) native neutral fraction, (B) native sulphated fraction and (D) permethylated sulphated fraction. (C) Negative mode MALDI-TOF spectra of native sulphated fraction.



**Figure 5:** Collision induced MALDI-Q-TOF fragmentation spectra of (A)  $[M+2Na-H]^+$  parent ion at 1021 of sulphated oligosaccharide  $SO_3Gal_2GlcNAc_1GalNAc-ol$  and (B)  $[M+Na]^+$  parent ion at 919 of on target desulphated oligosaccharide  $Gal_2GlcNAc_1GalNAc-ol$  isolated from human bronchial mucin.



**Figure 6:** Collision induced MALDI-Q-TOF fragmentation spectra of (A)  $[M+2Na-H]^+$  parent ion at 1245 of sulphated oligosaccharide  $SO_3Gal_2GlcNAc_1GalNAc-ol$  permethylated derivative and (B)  $[M+Na]^+$  parent ion at 1143 of on target desulphated oligosaccharide  $Gal_2GlcNAc_1GalNAc-ol$  permethylated derivative isolated from human bronchial mucin.



### **3. Material and methods**

#### ***3.1 Isolation of oligosaccharide–alditols***

As starting materials we used mucins from egg-jelly of *Rana temporaria* (1g), *Pleurodeles walt* (200mg) and human tracheobronchial mucins (quantity unknown). In each cases, mucins were submitted to reductive  $\beta$ -elimination for 72 h at 37 °C in 100 mM NaOH containing 1 M NaBH<sub>4</sub>. The reaction was stopped by the addition of DOWEX 50\*8 (25–50 mesh, H<sup>+</sup> form) at 4 °C until pH 6.5. After filtration on glass wool and evaporation to dryness, boric acid was eliminated by repetitive distillation as its methyl ester in the presence of methanol. The material was submitted to a first cationic exchange chromatography on DOWEX 50\*2 (200–400 mesh, H<sup>+</sup> form) to remove residual peptides. The fractions containing sugars were pooled and applied on a second Dowex 50\*2 column (200–400 mesh, H<sup>+</sup> form).

#### ***3.2 Thin Layer Chromatography***

After the second column, each fraction was tested on silica alumine TLC in rapid solvent (n-butanol/ethanol/Acetic acid/Pyridine/ H<sub>2</sub>O) (10: 100: 3: 10: 30). Oligosaccharides were detected after heating (120°C) in presence of sulfuric orcinol.

#### ***3.3 Permethylation of oligosaccharide-alditols***

All glycan samples were permethylated according to the NaOH/dimethyl sulfoxide method of Ciucanu and Kerek, 1984. The extraction method of per-methylated glycans was adapted for sulphate-containing oligosaccharides. Briefly, the reaction mixture was neutralized with 4N TFA before solid phase extraction on a Sep-pack C18 column. Permethylated oligosaccharides were eluted with ACN/ H<sub>2</sub>O 0,1% TFA (25:75).

#### ***3.4 Mass spectrometry analysis***

Native and permethylated samples were analysed on a Voyager-DE STR MALDI-Tof Mass Spectrometer, (PerSeptive Biosystems, Framingham, MA, USA), equipped with a 337 nm UV laser. Samples were spotted by mixing directly on the target 1  $\mu$ l of oligosaccharide

solution and 1  $\mu$ l of 2,5-dihydroxybenzoic acid matrix solution (10 mg/ml dissolved in MeOH/H<sub>2</sub>O 0,1% TFA).

For tandem mass spectrometry, native and permethylated oligosaccharides were mixed 1:1 with  $\alpha$ -cyano-4-hydrocinnamic acid matrix (in acetonitrile: 0.1% TFA, 99:1 v:v) and analysed on a Q-Tof Ultima MALDI instrument (Micromass). The nitrogen UV laser (337 nm wavelength) was operated at a repetition rate of 10 Hz under full power (300  $\mu$ J/pulse). MS survey data were manually acquired and decision to switch over to CID MS/MS acquisition mode for a particular parent ion was made on-the-fly upon examination of the summed spectra. Argon was used as the collision gas with a collision energy manually adjusted (between 50~200 V) to achieve optimum degree of fragmentation for the parent ions under investigation.

### **3.5 Sulphates dosage**

The sulfate content was measured by HPAEC according to Lo Guidice *et al.*(1994) Briefly, sulfate was released by hydrolysis with 1M HCl (500  $\mu$ l) for 5 h at 100 °C (291), and then HCl was evaporated under a stream of nitrogen. The residue was dissolved in 200  $\mu$ l of Milli-Q quality water (Millipore Corp., Milford, MA). 25 $\mu$ l of this solution were directly injected onto a Dionex BioLC system equipped with an IonPac AS4A column (250 x 4 mm), an anion micromembrane suppressor, and a CDM 2 conductivity detector. The column was eluted with 0.04 M NaOH at a flow rate of 2 ml/min, and the separated anions were measured by conductivity detection with 30-microsiemens sensitivity. The chromatograms were analysed and integrated with Chromeleon software, version 6.40 (Dionex Corporation). There was a linear relationship between conductivity and sulfate concentration up to 35 $\mu$ g/ml. A standard curve was constructed with K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solutions (6.25, 12.5, 25, and 35  $\mu$ g/ml) to measure sulfate released from oligosaccharide fractions.

#### 4 - References

- Burger, D., Simon, M., Perruisseau, G., and Steck, A. J. (1990) *J. Neurochem.* 54, 1569-1575.
- Ciucanu I. and Kerek F. (1984) *Carbohydr. Res.*, 131-209.
- Coppin A, Maes E, Morelle W, Strecker G (1999) *Eur J Biochem.*, 266, 94-104.
- Davril M, Degroote S, Humbert P, Galabert C, Dumur V, Lafitte JJ, Lamblin G, Roussel P. (1999) *Glycobiology* 9(3):311-21.
- Fiete, D., Snavastava, V., Hindsgaul, O., and Baenziger, J. U. (1991) *Cell* 67,1103-1110.
- Florea D, Maes E, Strecker G (1997) *Carbohydr. Res.* 302, 179-189.
- Hard, K., Van Zadelhoff, C., Moonen, P., Kamerling, J. P., and Vliegenthart, J. F. C. (1992) *Eur. J. Biochem.* 209,895-915.
- Hemmerich S, Leffler H, Rosen SD. (1995) *J Biol Chem.* 270:12035-47.
- Hooper, L. V., Beranek, M. C., Manzella, S. M., and Baenziger, J. U. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 5985-5993.
- Karlsson NG, Karlsson H, Hansson GC. (1995) *Glycoconj J.* 2(1), 69-76.
- Lamblin G, Degroote S, Perini J-M, Delmotte P, Scharfman A, Davril M, Lo-Guidice J-M, Houdret N, DumurV, Klein A, Roussel P (2001) *Glycoconjugate J* 18, 661-84.
- Lo-Guidice JM, Wieruszkeski JM, Lemoine J, Verbert A, Roussel P, Lamblin G (1994) *J Biol Chem.*269:18794-813.
- Maes E, Florea D, Delplace F, Lemoine J, Plancke Y, Strecker G. (1997) *Glycoconj. J.*,14,127-146.
- Robbe C, Capon C, Maes E, Rousset M, Zweibaum A, Zanetta JP, Michalski JC. (2003) *J Biol Chem.*278: 46337-48.
- Scharfman A, Arora SK, Delmotte P, Van Brussel E, Mazurier J, Ramphal R, Roussel P. (2001) *Infect Immun. Sep*;69(9):5243-8.
- Scharfman A, Delmotte P, Beau J, Lamblin G, Roussel P, Mazurier J. (2000) *Glycoconj J.* 17, 735-40.
- Spiro, R. G., and Bhoyroo, V. D. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 14351-14358.
- Strecker G, Wieruszkeski JM, Michalski JC, Alonso C, Boilly B, Montreuil J. (1992) *FEBS Lett.* 298(1):39-46
- Strecker G, Wieruszkeski JM, Michalski JC, Montreuil J. (1992) *Biochem J.* 287, 905-909.

Thomsson KA, Schulz BL, Packer NH, Karlsson NG. (2005) *Glycobiology*. 15: 791-804.

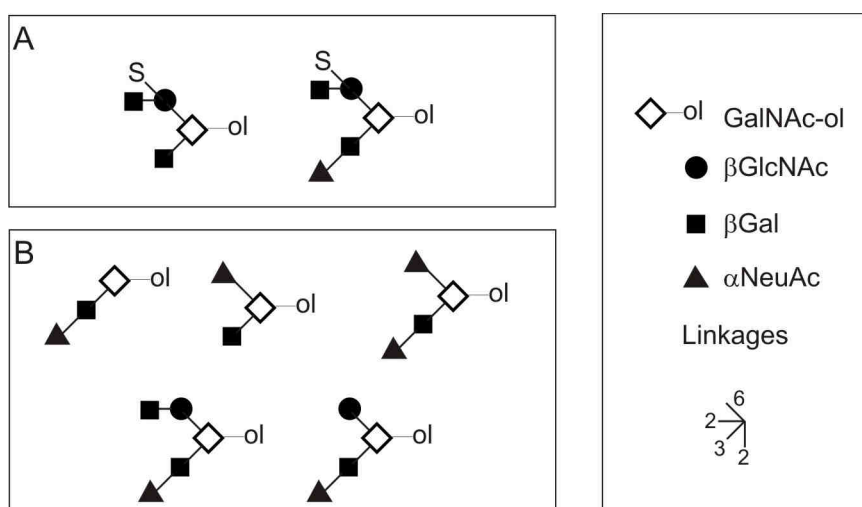
Thornton DJ, Sheehan JK. (2004) *Proc Am Thorac Soc*.1(1):54-61. Review.

Yuen, C.-T., Lawson, A. M., Chai, W., Larkin, M., Stoll, M. S., Stuart, A. C., Sullivan, F. X., Ahem, 1.1., and Feizi. 1. (1992) *Biochemistry* 31,9126-9131.

## 2.2 Application à la purification de structures sulfatées à partir d'ovomucines

Le munscrip précédent décrit une nouvelle méthode permettant d'isoler rapidement des composés sulfatés au sein d'un mélange complexe de structures neutres, sialylées et sulfatées. Nous l'avons vu avec les mucines oviductales de *Rana temporaria*, ce protocole est applicable à de grandes quantités d'oligosaccharides.

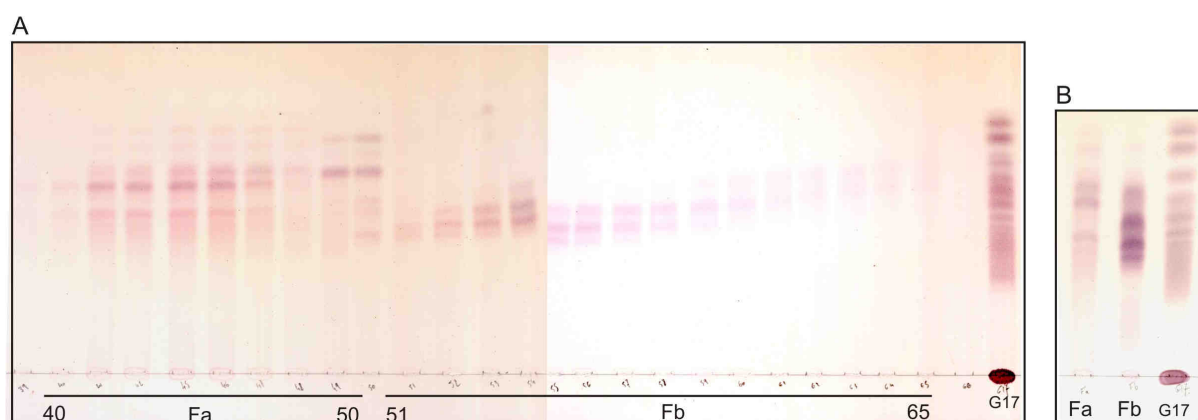
Dans le cadre d'une collaboration avec le Dr J. Bouckaert (Department of Molecular and Cellular Interactions, VIB, Bruxelles), nous souhaitons isoler des quantités importantes d'oligosaccharides sulfatés, afin de les co-cristalliser avec des lectines bactériennes. Une source pratique et facilement accessible de structures sulfatées est présente dans le blanc d'œuf. En effet, le blanc d'œuf est constitué de différentes glycoprotéines, entre autre il contient l'ovomucine, l'ovomucoïde, l'ovotransferrine et l'ovalbumine. Le profil de glycosylation de ces glycoprotéines ont été précédemment décrits (Parente *et al.*, 1982 ; Strecker *et al.*, 1992 ; Spik *et al.*, 1988). Si l'ovomucoïde et l'ovotransferrine présentent majoritairement des structures N-glycanniques, éventuellement sialylées, l'ovomucine porte des structures O-glycanniques sulfatées et sialylées (Figure 5) (Strecker *et al.*, 1989 ; Strecker *et al.*, 1992). La purification de cette glycoprotéine est outrageusement simple puisqu'elle précipite spécifiquement dans cinq volumes d'eau. Une fois les oligosaccharides libérés par  $\beta$ -élimination, nous avons appliqué la méthode précédemment décrite afin de purifier rapidement les composés sulfatés d'intérêt. Ceci a été réalisé chez différentes espèces d'oiseaux, permettant la comparaison des profils O-glycanniques de l'ovomucine mais aussi la détermination de la source présentant le plus d'oligosaccharides sulfatés.



**Figure 5 :** Structures O-glycanniques isolées d'ovomucine de poule. (A) Oligosaccharides sulfatés (Strecker *et al.*, 1989) ; (B) Oligosaccharides sialylés (Strecker *et al.*, 1992).

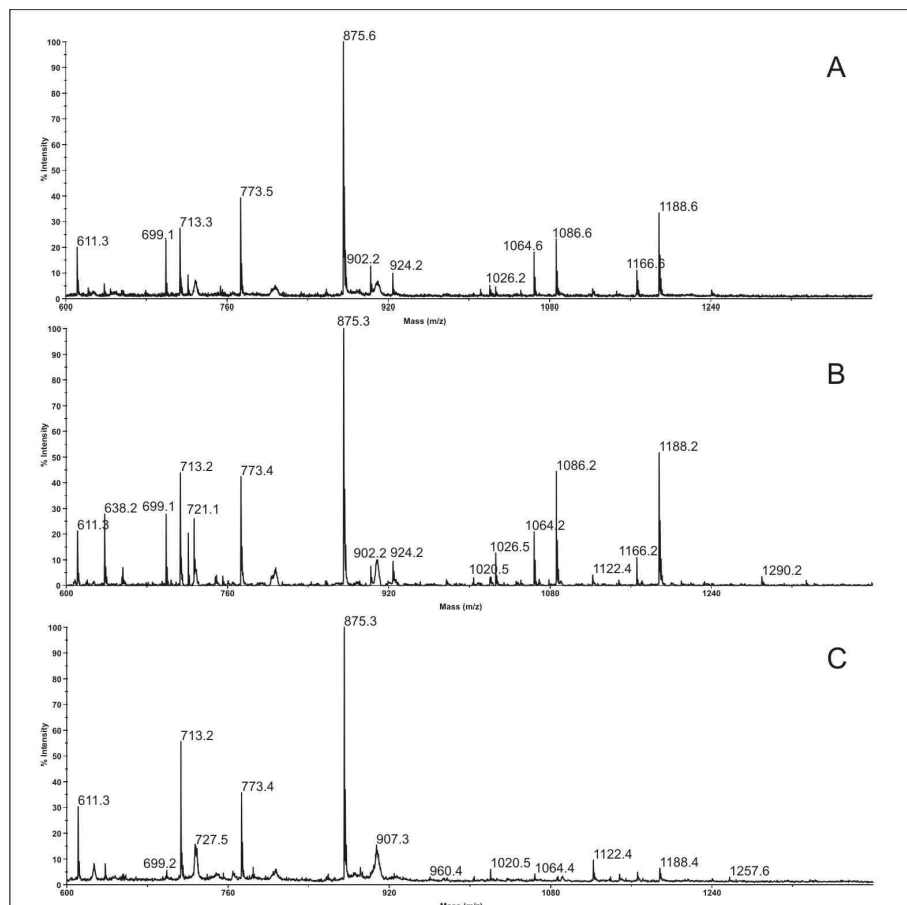
Ainsi, nous avons appliqué notre méthode à différentes ovomucine isolées des espèces d'oiseaux suivantes: l'oie domestique (*Anser anser*), la poule (*Gallus gallus*) et le colvert (*Anas platyrhynchos*).

Après  $\beta$ -élimination, le mélange d'oligosaccharide-alditols a été séparé sur une colonne d'échange de cations, conformément au protocole décrit dans le manuscrit. La figure 6A présente l'analyse sur chromatographie couche mince des différentes fractions issues de la colonne d'échange de cations d'oligosaccharides isolés de l'œuf d'oie. Deux fractions ont ainsi été définies. La première, exclue, comprend les fractions 40 à 50 (fraction A). La seconde, incluse, est constituée des fractions 51 à 65 (fraction B). La figure 6B présente les fractions A et B après rassemblement des différents tubes. De la même façon pour la poule et le colvert, deux fractions (A et B) ont été obtenues.



**Figure 6:** Chromatographie sur couche mince (A) des différentes fractions d'oligosaccharides d'ovomucine d'oie révélées par orcinol-sulfurique après séparation sur une colonne d'échange de cations ; (B) des fractions A et B après rassemblement des tubes.

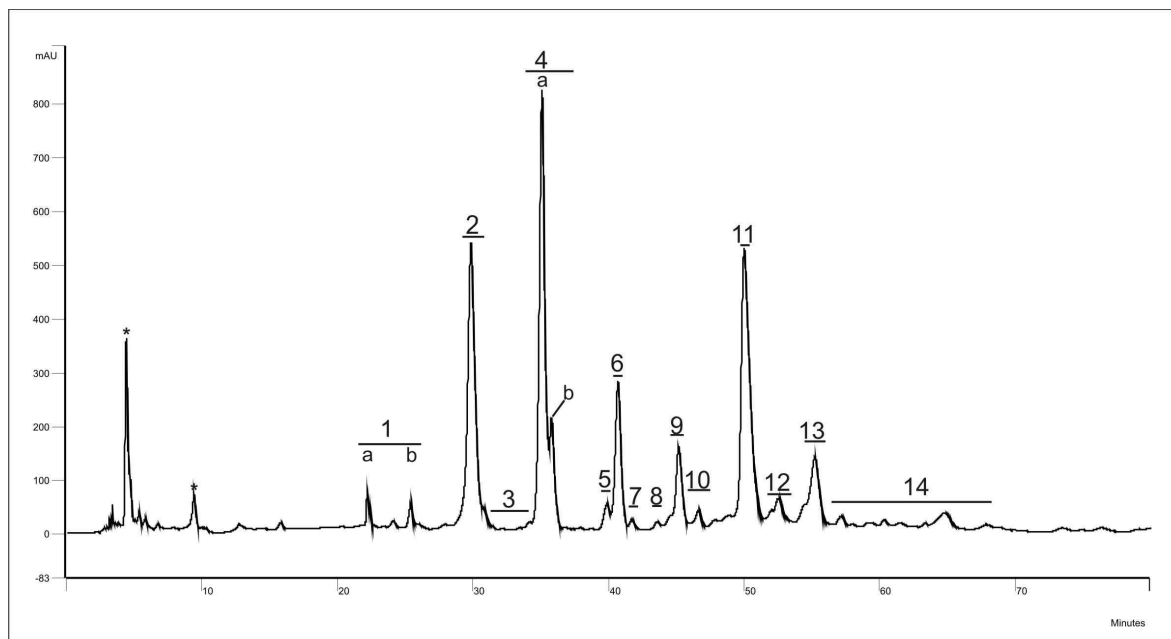
Les fractions A et B issues des différentes espèces d'oiseaux ont été analysées par MALDI-MS. La fraction A, exclue, (Figure 7) contient majoritairement des O-glycannes sulfatées, ainsi que des produits sialylés, mineurs (Tableau 2). La fraction B, incluse, est quant à elle majoritairement constituée de N-glycannes (données non présentées).



**Figure 7 :** Profils par MALDI-MS de la fraction O-glycannique A isolée d’ovomucine de différentes espèces d’oiseaux. (A) poule ; (B) Oie ; (C) colvert.

Les profils obtenus par MALDI-MS sont très similaires entre espèces. Seules les intensités relatives entre les différents produits semblent varier. Le composé majeur à  $m/z=875$  (correspondant à la formule brute  $(\text{HSO}_3^-)\text{HexNAcHex}_2\text{HexNAc-ol}$ ) est commun aux différentes espèces d’oiseaux. Cependant, les fractions sulfatées ensuite analysées par HPLC pour chacune des espèces semblent indiquer que les différentes espèces d’oiseaux présenteraient différents composés isobares (résultats non présentés). Aussi, nous envisageons de caractériser par RMN individuellement chacun des composés afin d’effectuer une comparaison inter-espèce des O-glycannes sulfatés portés par l’ovomucine. Dans ce but, nous avons initié l’analyse systématique des O-glycannes isolés d’ovomucine de poule.

La première étape a consisté à isoler chacun des oligosaccharides de la fraction A par HPLC en phase normale. Chaque fraction a été systématiquement collectée (Figure 8).



**Figure 8:** Séparation par HPLC sur une colonne de type amine des oligosaccharides-alditols libérés de l'ovomucine de poule par  $\beta$ -élimination réductrice.

Les pics majeurs ont été dessalés puis analysés par RMN. Le tableau suivant (tableau 3) présente les structures purifiées par HPLC et caractérisée par RMN. La fraction 6 contient de façon surprenante un composé sialylé, dont la structure avait été précédemment décrite. La présence de ce composé est certainement due à une contamination lors du rassemblement des fractions. Le composé 4, majoritaire, correspond au signal à  $m/z = 875$ , également majoritaire lors de l'analyse par spectrométrie de masse. Le composé 11 a également été précédemment décrit, il correspond au signal à  $m/z = 1166$ . La fraction 9 contient deux composés en mélange, le composé majoritaire correspondant à la fraction 11 ainsi que le nouveau composé, minoritaire, noté 9\* (signal à  $m/z = 1026$ ). La fraction 13 contient un oligosaccharide sulfaté disialylé, jamais décrit, qui n'a pas été observé par MALDI-MS, certainement du fait d'une désulfatation ou d'une désialylation sur la cible au moment de l'analyse.

L'analyse des différents oligosaccharides a été effectuée par RMN. Les déplacements chimiques ont été attribués à partir des données expérimentales issues des spectres protons ( $^1\text{H}$ ) à une et deux dimensions homo- ou hétéronucléaires,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY 90, COSY relayés et  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC.



Attribution des signaux observés lors de l'analyse de l'oligosaccharide présent dans la fraction 4 :

Le spectre  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (Figure 9) montre d'une part la présence de 3 protons anomères possédant des déplacements chimiques compris entre 4.4 et 4.7 ppm. L'oligosaccharide analysé comprend donc 3 monosaccharides notés II, II' et III'. D'autre part, l'observation de 2 pseudotriplets à  $\delta$  4.327 4.267 ainsi qu'un quadruplet à 4.052 ppm indique, comme attendu, la présence d'un résidu de GalNAc-ol (I). Ces déplacements chimiques sont conformes et en tous points identiques à un résidu de N-Acetyl-Galactosaminitol substitué en 3 et 6 par respectivement un résidu de  $\beta$ -Galactosyl et un résidu de N-Acetyl-Glucosamine formant ainsi un noyau O-glycannique de type 2 [ref] .

Par ailleurs, la lecture des déplacements chimiques et des constantes de couplage vicinales ( $^3J$ ) sur le spectre COSY 90 a permis de déterminer les systèmes de spins de chacun des résidus présents dans cet oligosaccharide.

Le système de spin relatif au H-1 à 4.462 ppm correspond à un résidu de configuration  $\beta$ -Galacto (II). En effet les protons 2, 3 et 4 de ce résidus possèdent des  $^3J_{\text{H,H}}$  de 7.5, 7.5 et 1 Hz respectivement [Koerner T.A.W., Prestegard J.H. and Yu R. K. (1987) Oligosaccharide structure by two-dimensional Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, *Methods in Enzymology*, **138**, 38-59] De plus les  $\delta$  de ces protons (table 3) correspondent au résidu de  $\beta$ -Gal non substitué constitutif du noyau 2.

De la même manière et partant du proton H-1 à 4.584 ppm, le système de spin qui lui est dépendant correspond en tous point à un résidu de configuration  $\beta$ -gluco. Ce résidu possède son carbone 2 à 52.6 ppm ce qui démontre la présence d'un groupement N-Acétyle à cette position. Ainsi le résidu est aisément identifié comme étant le résidu de N-Acetyl-glucosamine (II') lié en position 6 sur le GalNAc-ol. De plus, la présence de protons résonant à 4.420 et 4.327 ppm sont caractéristiques de protons 6 et 6' portés par un carbone sulfaté d'une osamine. *De facto*, ces signaux indiquent sans ambiguïté que cette osamine III' est sulfatée en 6. L'identification de ses carbones sur le spectre HSQC indique que ce résidu est également substitué en C4 comme l'indique les déplacements chimiques du proton H-4 et surtout de son carbone 4 à 3.800 et 78.7 ppm respectivement.

Enfin, la présence d'un dernier proton d'anométrie  $\beta$  ( $^3J_{\text{H}_1,\text{H}_2} > 7$  Hz) à  $\delta$  4.539 est identifié comme appartenant à un résidu de  $\beta$ -Galactose (III'). En effet les protons H2, H3 et H4 de cette unité exhibent des constantes de couplage compatibles avec cette configuration. Les déplacements chimiques de ceux-ci (table 4) montre que ce  $\beta$ -Galactose III' est en

position terminal non réductrice. Ce résidu est en fait lié en position 4 sur la NAcetylglucosamine.

Compte tenu de toute ces informations parfaitement compatible avec la littérature et les banques de données de références, cet oligosaccharide possède sans ambiguïté la séquence suivante : Gal( $\beta$ 1,3) [Gal( $\beta$ 1,4) (HSO<sub>3</sub>)<sub>6</sub>GlcNAc( $\beta$ 1,6)GalNAc-ol] (Strecker et al., 1989). Il est à noter que celui-ci est déjà référencé dans la sweet-DB ([http://www.glycosciences.de/sweetdb/start.php?action=query\\_structure\\_exact](http://www.glycosciences.de/sweetdb/start.php?action=query_structure_exact)) sous l'identifiant LINUCS 3460.

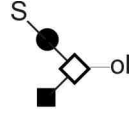
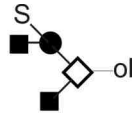
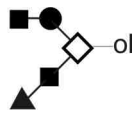
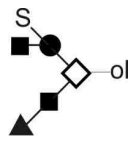
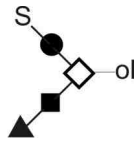
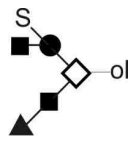
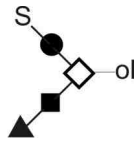
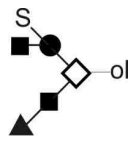
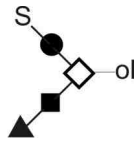
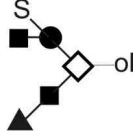
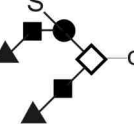
De la même manière et sachant que les molécules ont des structures homologues et dérivées nous avons caractérisé les différents oligosaccharides répertoriés dans les tableaux 3 et 4.

En conclusion, ces travaux préliminaires sur l'ovomucine de poule nous ont permis de caractériser de nouvelles structures sulfatées. Cette étude devra être complétée par la caractérisation systématique des composés présents dans l'ovomucine d'oie et de colvert. Outre la caractérisation de nouvelles structures sulfatées, cette étude nous permettra d'établir l'éventuelle spécificité d'espèces des structures O-glycanniques d'oiseaux. Les résultats préliminaires obtenus en spectrométrie de masse et la comparaison des profils HPLC des différentes fractions sulfatées démontrent la présence chez les différentes espèces de composés différents mais isobares. De plus, outre une diversité des structures O-glycanniques, il semble que les différentes espèces diffèrent également du fait de leur composition en acide sialique. En effet, sur les ovomucines, une hydrolyse spécifique des acides sialiques, ensuite couplés de façon spécifique à un fluorophore afin de les observer lors d'une séparation par HPLC a permis d'établir la présence de nombreux acides sialiques différents, acétylés, variable selon l'espèce considérée. Ainsi, il semble que l'ovomucine porte des motifs spécifiques selon l'espèce d'oiseau considérée. De plus, si cette méthode nous a permis d'isoler des structures sulfatées, des motifs particuliers disialylés (NeuAc-NeuAc), ont pu être mis en évidence sur des composés N-glycanniques présents dans la fraction incluse (fraction B) (résultats non présentés). Ainsi notre méthode de purification d'oligosaccharides sulfatés a également permis de sous-fractionner une population oligosaccharidique particulière, comprenant des composés N-glycanniques, certains portant des motifs particuliers, disialylés. La présence de structures polysialylées a été reportée sur la N-CAM (Neural Cell Adhesion Molecule) chez le poulet (Inoue *et al.*, 2000). Elle n'avait cependant jamais été démontrée sur des glycoprotéines n'appartenant pas au système nerveux.

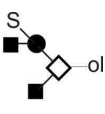
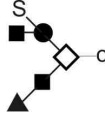

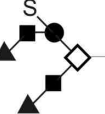
**Tableau 2:** Attribution des signaux observés par spectrométrie de masse (MALDI-MS) sur les profils des *O*-glycannes d'ovomucine libérés par  $\beta$ -élimination (fraction A) (\* *produits de désulfatation sur la cible*).

m/z			Formule brute				
$[M+Na]^+$	$[M+2Na-H]^+$	$[M+3Na-2H]^+$	HexNAc-ol	Hex	HexNAc	(HSO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	NeuAc
611*			1	1	1		
699			1	1			1
	713		1	1	1	1	
773*			1	2	1		
	875		1	2	1	1	
902			1	1	1		1
	924*		1	1	1		1
		1026	1	1	1	1	1
1064*	1086*		1	2	1		1
	1166	1188	1	2	1	1	1

**Tableau 3 :** Structure des O-glycannes majeurs isolés d'ovomucine de poule.

Fraction HPLC	Structure				
2					
4					
6					
9	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 50%; text-align: center;">majeur</th> <th style="width: 50%; text-align: center;">Mineur *</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;"></td> <td style="text-align: center;"></td> </tr> </tbody> </table>	majeur	Mineur *		
majeur	Mineur *				
					
11					
13					

**Tableau 4 :** Table des déplacements chimiques des protons des résidus des différents oligosaccharides isolés d'ovomucine de poule.

Fraction		F4	F9/F11	F9*	F13
Résidu	Proton				
GalNAc-ol (I)	H-1/H-1'	3.77	3.81/3.75	3.71/3.75	3.76
	H-2	4.387	4.390	4.393	4.387
	H-3	4.058	4.066	4.070	4.067
	H-4	3.468	3.437	3.435	3.441
	H-5	4.272	4.254	4.255	4.271
	H-6/H-6'	3.942/3.676	3.938/3.666	3.94/3.67	3.941/3.676
	NAc	2.063	2.067	2.067	2.065
GlcNAc(β1,6) (II')	H-1	4.584	4.582	4.558	4.578
	H-2	3.773	3.758	3.721	3.776
	H-3	3.692	4.692	3.52	4.389
	H-4	3.772	3.77	3.52	n.d.
	H-5	3.808	3.810	3.805	3.813
	H-6/H-6'	4.420/4.327	4.415/4.331	4.357/4.236	4.429/4.330
	NAc	2.063	2.067	2.067	2.065
Gal(β1,3) (II)	H-1	4.462	4.532	4.532	4.462
	H-2	3.571	3.611	3.611	3.575
	H-3	3.669	4.114	4.114	4.115
	H-4	3.898	3.930	3.930	3.929
	H-5	3.71	3.70	3.70	n.d.
	H-6/H-6'	3.77	3.76	3.76	n.d.
Gal (β1,4) (III')	H-1	4.539	4.536	-	4.617
	H-2	3.530	3.529	-	3.553
	H-3	3.677	3.677	-	4.120
	H-4	3.928	3.925	-	3.968
	H-5	3.71	3.71	-	n.d.
	H-6/H-6'	3.77	3.77	-	n.d.
NeuAc (α2,3) 3,4,6	H-3ax	-	1.801	1.801	1.803/1.798*
* NeuAc (α2,3) 3,3	H-3eq	-	2.773	2.773	2.748/2.776*
	H-4	-	3.687	3.687	3.687/3.687*
	N-Ac	-	2.034	2.034	2.029/2.032*

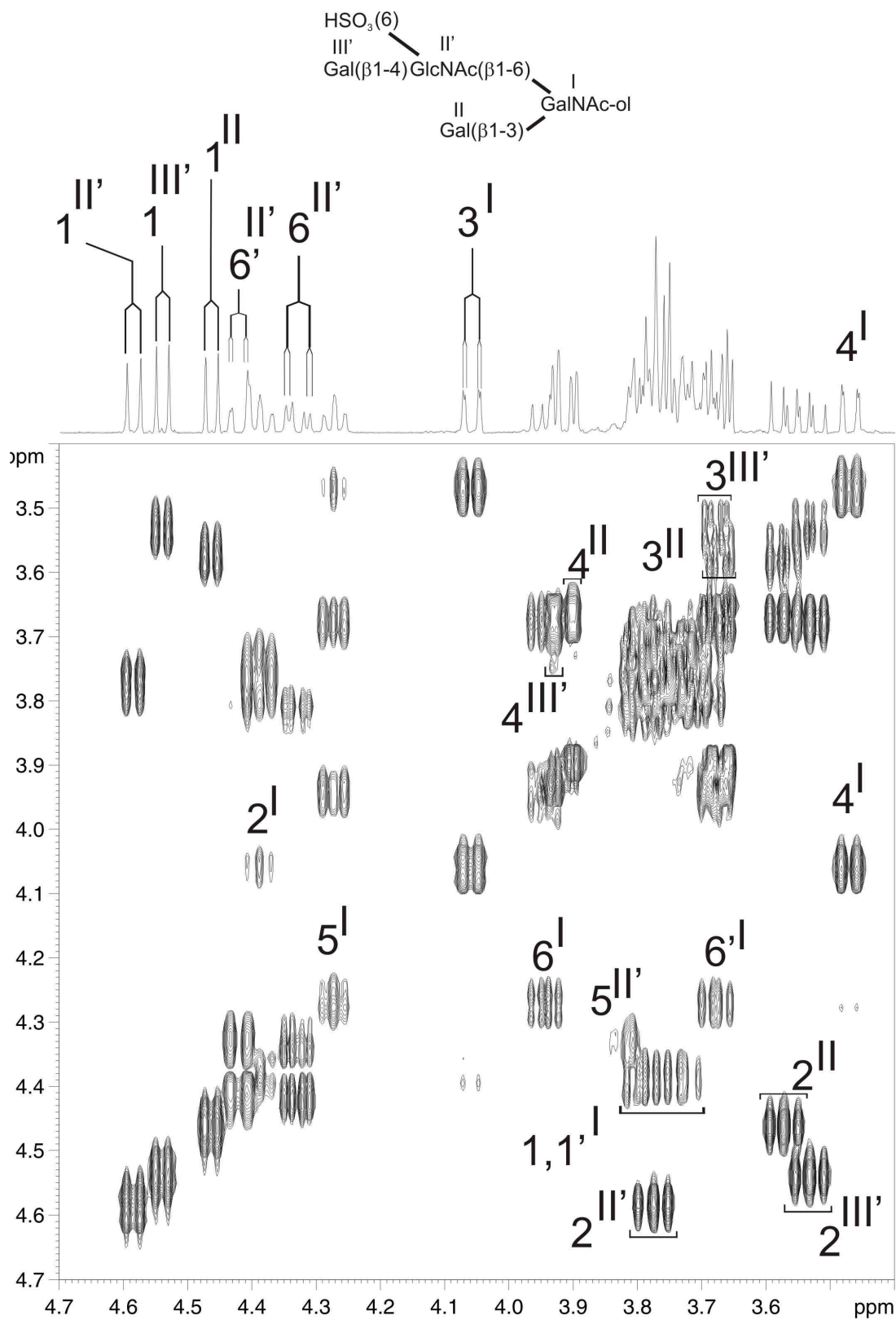


Figure 9 : Spectre COSY 90 homonucléaire  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  de l'oligosaccharide-alditol isolé dans la fraction 4.

#### IV-Conclusion

Les travaux présentés dans cette première partie concernent l'étude de la diversité des O-glycannes de type mucine. Ainsi, l'analyse des structures des O-glycannes de type mucine portées par les glycoprotéines salivaires de la guêpe et du frelon a démontré pour la première fois la présence de structures O-glycanniques complexes chez deux espèces d'insectes. Chez le frelon *Vespa crabro*, les structures sont homogènes, constituant une famille présentant majoritairement le noyau de type 1, caractérisée par des oligomères de Gal. En revanche, chez la guêpe *Vespula germanica*, nous avons décrit une famille très hétérogène, présentant des noyaux de type 1, 2 et 3, ainsi que la présence de motif Le<sup>x</sup>. Nous avons de plus mis en évidence une activité fucosyltransférase inhabituelle se traduisant par le transfert d'un résidu de Fuc directement sur la GalNAc en position terminale réductrice. Ainsi, ces travaux démontrent que la O-glycosylation chez les insectes n'est pas limitée aux simples antigènes T et Tn. De plus, si chez la guêpe la présence de O-glycannes chargés, substitués par de la phosphoéthanolamine avait été déterminée, il semble que chez le frelon, les groupements phosphoéthanolamine seraient portés uniquement par des structures N-glycanniques, impliquant une certaine spécificité d'espèce.

Par ailleurs, l'étude de O-glycannes issus de différentes sources de mucines sulfatées a permis de mettre au point une méthode de purification des composés sulfatés en une seule étape, rapide et très simple, basée sur une chromatographie d'échange de cations. Cette méthode a été validée par la purification systématique de composés sulfatés isolés de différentes sources biologiques, contenant des mélanges complexes de structures O-glycanniques neutres, sialylées ou sulfatées. Le fait que cette méthode soit applicable aussi bien sur de très grandes quantités que sur des faibles quantités telles que celles recueillies sur des prélèvements biologiques en fait une méthode de choix.

A l'avenir, l'utilisation de cette méthode devrait permettre d'aller plus loin dans l'étude de la biodiversité des structures O-glycanniques en mettant plus facilement en évidence des structures sulfatées, souvent difficiles à décrire lorsqu'elles sont étudiées en mélange. De plus nous l'avons vu dans l'étude préliminaire des ovomucines, le sous-fractionnement d'un mélange de diverses structures glycanniques peut permettre l'observation de composés inhabituels, tels que les motifs disialylés (NeuAc-NeuAc) sur les N-glycannes de cette glycoprotéine.

## Partie B

# Diversité structurale des glycoconjugués microbiens



La N-glycosylation est une modification post-traductionnelle impliquant la liaison covalente d'un oligosaccharide sur un résidu asparaginyll d'une protéine, formant ainsi une liaison N-glycosidique. Quel que soit l'organisme eucaryote considéré, le processus de N-glycosylation est initié dans le réticulum endoplasmique (RE) par la biosynthèse d'un oligosaccharide précurseur lié à un lipide lors d'une voie métabolique particulière: le cycle des dolichols. Immédiatement après transfert de l'oligosaccharide précurseur par l'OligoSaccharylTransférerase (OST), les réactions d'élagage commencent dans le réticulum endoplasmique et se poursuivent dans le cis Golgi. Ces étapes sont particulièrement bien définies, s'appliquent indifféremment à toute protéine et limitent les possibilités de diversification des structures N-glycanniques. Ainsi, dans les premiers saccules golgiens, les glycoprotéines portent des structures assez uniformes, reflétant la conservation d'étapes d'élagage communes, préservant le noyau pentasaccharidique  $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ . Ensuite, dans le Golgi médian et trans, l'action subséquente de glycosyltransférases et glycosidases golgiennes, plus aléatoire, sera à l'origine de l'immense variété structurale des N-glycannes.

Le passage d'une uniformité structurale dans le RE à une extrême diversité après remaniement dans les différents compartiments golgiens coïncide clairement avec un changement de fonction des N-glycannes. Dans le réticulum endoplasmique, les glycannes aident à la mise en conformation de la protéine, à son contrôle-qualité (Helenius et Aebi, 2004), à son adressage vers le Golgi et/ou vers le lysosome (Hauri *et al.*, 2000). Ensuite, les enzymes golgiennes agissent et modifient les structures N-glycanniques pour les adapter à des rôles variés sur la protéine mature.

L'illustration des multiples rôles de la N-glycosylation a motivé l'analyse structurale des N-glycannes chez de nombreux organismes, parfois assez exotiques, visant :

- la comparaison de cellules ou tissus humains sains et pathologiques
- la compréhension des interactions hôte-pathogène
- l'exploitation de certaines cellules en vue de la production de protéines recombinantes
- l'exploration des voies métaboliques impliquées dans cette modification post-traductionnelle particulière chez des organismes modèles tels que *Saccharomyces cerevisiae* ou *Drosophila melanogaster*.

L'exploration de la diversité structurale des N-glycannes a montré que la composition en monosaccharides ainsi que le nombre et la taille des antennes peut considérablement varier selon la protéine considérée, les types cellulaires, les tissus et surtout l'espèce. Cependant, malgré l'extrême variété des structures existantes, ces études révèlent la conservation d'une structure minimale, commune à tous les N-glycannes, le noyau pentasaccharidique  $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ .

L'existence d'un noyau commun est en partie liée à la conservation de l'étape princeps, réticulaire de la N-glycosylation, le cycle des dolichols. Si dans son principe, le cycle des dolichols est conservé, les quelques données structurales concernant la N-glycosylation chez les protistes montrent néanmoins que certains organismes tels que *Trypanosoma cruzii*, *Leishmania mexicana* ou *Tetrahymena pyriformis* présentent leur propre voie de biosynthèse (Parodi, 1993). Certes les mécanismes de biosynthèse des N-glycannes chez ces parasites ne présentent que de légères modifications du cycle des dolichols, mais ces travaux nous indiquent que le transfert d'un précurseur unique, l'oligosaccharide  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ , n'est pas systématiquement conservé.

Dans ce contexte, l'étude de Samuelson et collaborateurs, publiée en 2005, est particulièrement intéressante (Samuelson *et al.*, 2005). Désireux d'étudier la conservation du processus de N-glycosylation au cours de l'évolution, les auteurs ont exploré les bases de données protéiques et génomiques à la recherche des protéines majeures impliquées dans le cycle des dolichols, notamment des glycosyltransférases de type ALG (glycosylation liée à l'asparagine). Le répertoire de glycosyltransférases présents au sein d'un organisme leur a permis de prédire le précurseur oligosaccharidique théoriquement synthétisé. Si la confrontation des données structurales et des prédictions bioinformatiques a pu être effectuée pour de nombreux organismes, elle n'a pu se faire chez les parasites intracellulaires obligatoires, faute de données structurales.

Nous avons ainsi étudié les profils de glycosylation de deux microsporidies distantes: *Encephalitozoon cuniculi* et *Antonospora locustae*, parasites envahissant respectivement les mammifères et les insectes. On considère que ces organismes dérivent des champignons et qu'ils ont ensuite rapidement divergé, réduisant leur génome à l'extrême (Keeling 2003; Thomarat *et al.* 2004). Le récent séquençage d'*E. cuniculi* en fait un excellent modèle de référence pour l'étude des parasites intracellulaires ne possédant pas de mitochondries. *Encephalitozoon cuniculi*, figure dans l'étude publiée par Samuelson et collaborateurs. Toutes les enzymes de type ALG semblent absentes, suggérant l'absence totale de N-glycosylation chez cette microsporidie modèle.

De plus, nous avons choisi de déterminer le profil de *N*-glycosylation de *T. gondii*, parasite intracellulaire obligatoire appartenant au phylum des Apicomplexa. Ce phylum regroupe de nombreux pathogènes d'incidence majeure dont *T. gondii* constitue un excellent modèle d'étude. Ce parasite est facile à cultiver et à manipuler génétiquement. De plus, il partage un grand nombre de caractéristiques biologiques avec les autres membres de son phylum. Si les structures des ancras Glycosyl Phosphatidyl Inositol (GPI) ont été décrites, la présence de *N*-glycannes chez les Apicomplexa est très controversée. Les recherches bioinformatiques concernant le cycle des dolichols chez *T. gondii* indiquent que certaines glycosyltransférases de type ALG manquent, prédisant ainsi la biosynthèse d'un oligosaccharide tronqué, Glc<sub>3</sub>Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub> (Samuelson *et al.*, 2005). Ainsi, nous avons envisagé d'étudier la biosynthèse des *N*-glycannes chez *T. gondii* en établissant sans ambiguïté le profil de *N*-glycosylation des protéines de tachyzoïtes, forme intracellulaire, virulente du parasite chez son hôte intermédiaire.

*Ainsi, nous avons cherché à établir clairement les potentiels de N-glycosylation de ces différents protistes, parasites intracellulaires obligatoires, afin de confronter les données expérimentales aux prédictions issues de la recherche bioinformatique des enzymes de type ALG. Si dans leur approche ces deux études étaient assez similaires, les méthodes biochimiques employées dans ces deux travaux étant sensiblement les mêmes, les conclusions issues de ces deux travaux sont très différentes.*

# I - Généralités sur la N-glycosylation

## 1. Définition

La N-glycosylation est une modification post-traductionnelle commune chez les eucaryotes impliquant la liaison covalente d'un oligosaccharide sur un résidu d'asparagine au sein d'une séquence consensus Asn-X-Ser/Thr (X ≠ Proline). Tous les N-glycannes ont en commun un noyau pentasaccharidique, le trimannosyl-di-N-acétylchitobiose (Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub>).



**Figure 1 :** Les trois types de structure N-glycanniques. *A* : type complexe ou N-lactosaminique; *B* : type oligomannosidique ou « high-mannose » ; *C* : type hybride ; *D* : chaîne lactosaminique de type 1 et 2 (Structures classiques de mammifères). Noir : noyau ; bleu : antennes ; vert : sucres périphériques ou terminaux.

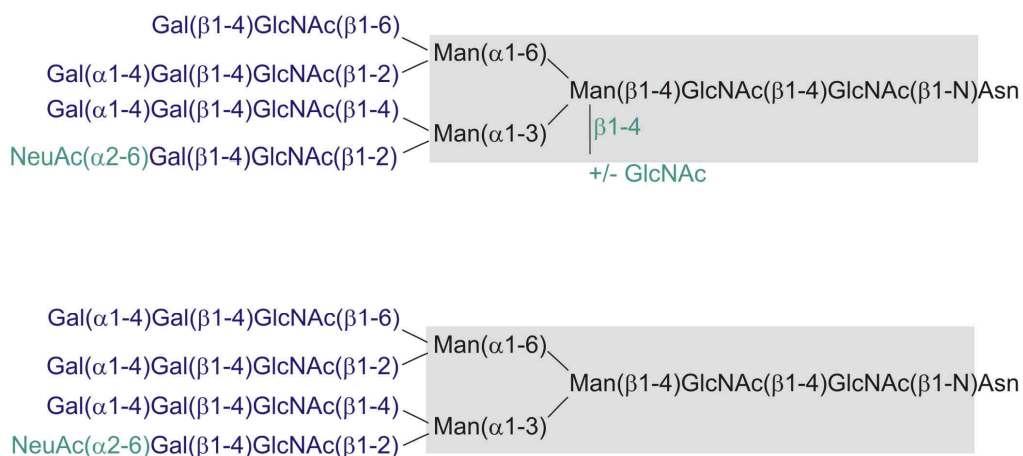
Selon la substitution de ce noyau, on distingue classiquement trois types de N-glycane: le type N-acétyl-lactosaminique ou complexe, le type oligomannosidique et le type hybride (Figure 1). Pour les N-glycannes de type complexe, l'élongation peut se faire par des antennes N-acétyllactosaminiques de type 1 : Gal( $\beta$ 1-3)GlcNAc $\beta$  ou de type 2 : Gal( $\beta$ 1-4)GlcNAc $\beta$ .

La diversité structurale des N-glycannes de type complexe ou hybride réside en particulier dans les possibilités de substitution à leur extrémité par des sucres dits périphériques ou terminaux. Le plus souvent, la périphérie comprend des monosaccharides d'anométrie  $\alpha$ , en positions terminales non-réductrices, sur les antennes ou directement sur le noyau. Chez les mammifères, ces monosaccharides consistent généralement en des unités de Fuc ou NeuAc. Le plus souvent ce sont des acides sialiques liés en  $\alpha$ -2,3 ou  $\alpha$ -2,6 sur un Gal terminal ou du Fuc en ( $\alpha$ 1,6) sur le noyau ou en ( $\alpha$ 1,3) sur un Gal ou une GlcNAc terminale. Chez l'homme, ces sucres périphériques peuvent constituer le support de motifs antigéniques. Enfin, les N-glycannes peuvent posséder des résidus de Gal 3-, 4- ou 6-sulfate ainsi que de la GlcNAc-6-phosphate.

## **2. Biodiversité des structures N-glycanniques chez les eucaryotes**

L'exploration des diverses structures N-glycanniques synthétisées par les eucaryotes permet d'illustrer le contraste flagrant existant entre la conservation quasi systématique du noyau pentasaccharidique et l'extrême variabilité des structures existantes en terme de monosaccharides, d'antennes, de taille, mais aussi de fonctions.

Chez les oiseaux, l'originalité des structures N-glycanniques isolées de l'ovomucine de pigeon consiste en la présence du motif Gal( $\alpha$ 1,4)Gal, qui n'est retrouvé que chez certains sous-groupes d'oiseaux (Figure 2). Les structures N-glycanniques isolées de ces animaux sont généralement des types complexes allant jusqu'à des structures pentaantennées, éventuellement sialylées en ( $\alpha$ 1,6), mais l'on décrit également des structures oligomannosidiques, minoritaires (Suzuki *et al.*, 2003 ;Suzuki *et al.*, 2004; Takahashi *et al.*, 2001).



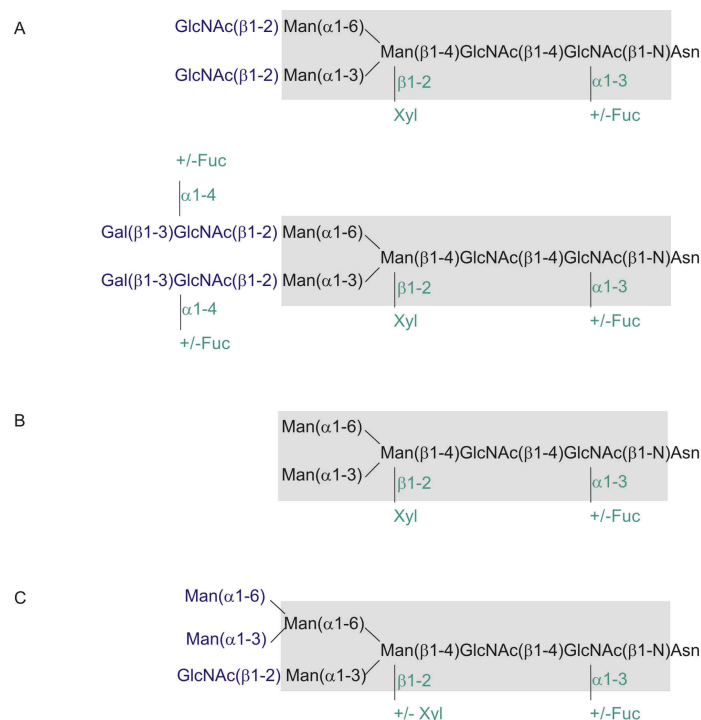
**Figure 2:** Structures N-glycanniques isolées d'ovomucine de pigeon (d'après Suzuki *et al.*, 2003).

Chez les plantes, outre les structures oligomannosidiques, allant de  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  à  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  (Lerouge *et al.*, 1998), résultat d'un élagage limité de l'oligosaccharide précurseur  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ , la caractérisation des structures N-glycanniques isolées de germe de soja et de calréticuline d'épinard a mis en évidence la synthèse de glycannes hybrides et complexes, caractérisés par la présence de résidu(s) de  $\text{Fuc}(\alpha 1,3)$  et/ou de  $\text{Xyl}(\beta 1,2)$  respectivement liés à la GlcNAc proximale ou au résidu de  $\text{Man}(\beta 1,4)$ , ainsi que la synthèse du motif Lewis A. De plus, chez les plantes est décrite la structure paucimannose contenant du  $\text{Fuc}(\alpha 1,3)$  et du  $\text{Xyl}(\beta 1,2)$  (Figure 3). Les structures particulières présentant du  $\text{Fuc}(\alpha 1,3)$  sur la GlcNAc proximale sont partagées avec les insectes (Rendic *et al.*, 2007).

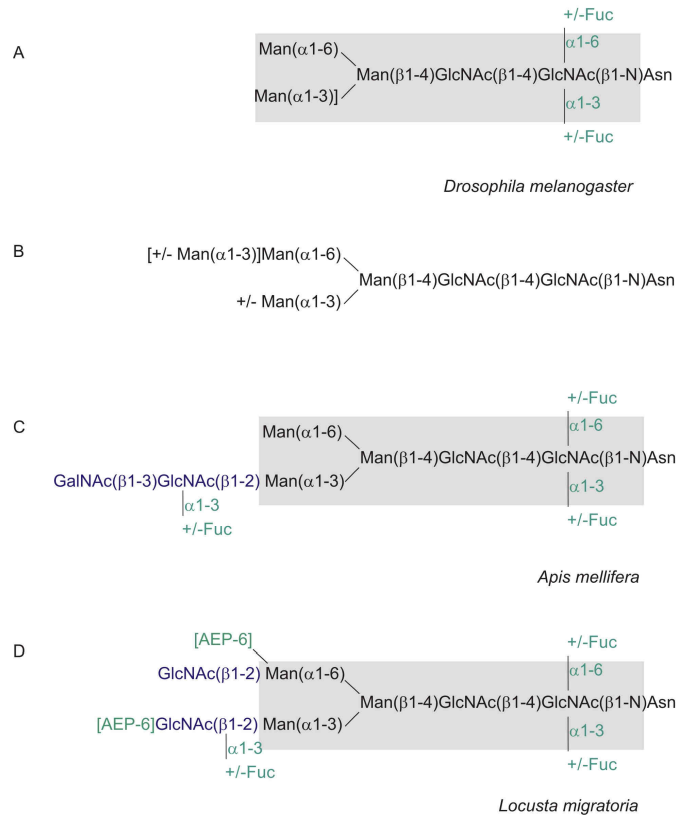
En effet, outre la présence de structures oligomannosidiques, on retrouve chez les insectes une structure de type paucimannose difucosylée (Figure 4A), particulièrement allergène, décrite uniquement chez la drosophile. De plus, les paucimannoses non fucosylés ou portant un unique Fuc lié en  $\alpha 1,6$  sur la GlcNAc proximale sont très fréquents chez de nombreuses espèces d'insectes (Rendic *et al.*, 2007). Si la présence d'acide sialique chez les insectes a toujours été très controversée, des structures chargées, portant de la phosphoéthanolamine (AEP) ont été décrites chez le locuste *Locustae migratoria* (Hård *et al.*, 1993) (Figure 4D). Chez les insectes une exception à la conservation du noyau pentasaccharidique est observée (Figure 4B). Des structures N-glycanniques tronquées ont en effet été décrites chez la drosophile (Seppo et Tiemeyer, 2000 ; North *et al.*, 2006) mais aussi sur la phospholipase A2 (PLA2) d'*Apis mellifera* (Kubelka *et al.*, 1993). Cette protéine

présente également un pseudo motif Lewis X, la fucosylation ne se faisant pas sur une chaîne LacNAc mais sur une chaîne LacdiNAc : GalNAc( $\beta$ 1,4)GlcNAc.

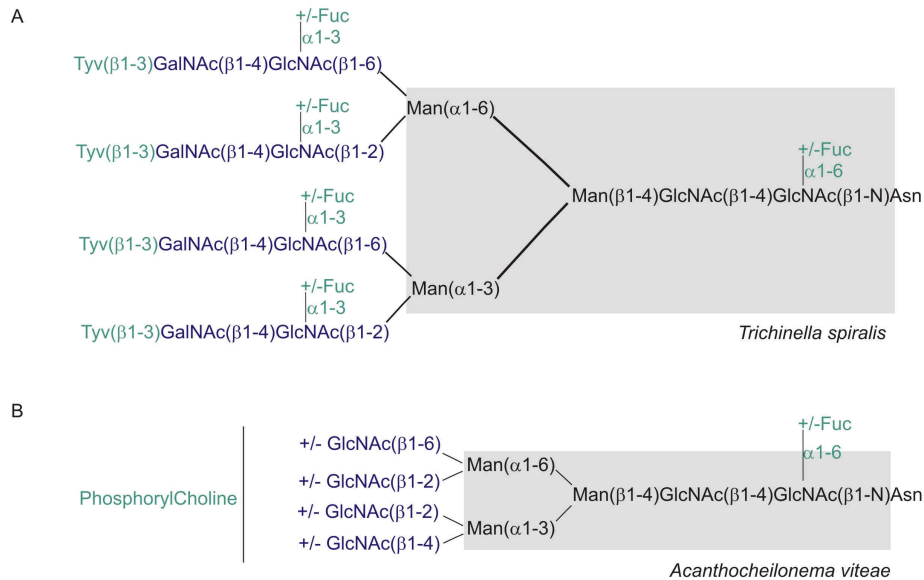
Ce type de structure LacdiNAc fucosylées est retrouvé chez les nématodes (Figure 5). En effet, ces parasites présentent majoritairement des N-glycannes de type complexe et hybride, constitués d'antennes di-N-acétyllactosaminiques parfois largement substitué par du Fuc( $\alpha$ 1,6) sur le noyau ou de Fuc( $\alpha$ 1,3) sur les antennes. Cette élongation est assez rare, la plupart des animaux supérieurs portant des antennes LacNAc de type 2. L'élucidation des interactions existant entre certaines espèces de nématodes et leur hôte a permis la description de structures N-glycanniques uniques. Chez *Trichinella spiralis*, la périphérie est particulièrement exotique, puisque les GalNAc terminales peuvent être systématiquement protégées par du tyvélose (3,6-dideoxy-D-arabino-hexose) (Tyv). Les protéines portant ces structures joueraient un rôle dans l'invasion tissulaire. Tout aussi surprenante, la substitution des N-glycannes complexes par de la phosphorylcholine chez *Acantocheilonema viteae* à laquelle serait attribuée des propriétés immunosuppressives.



**Figure 3:** Structures de N-glycannes de type A : complexe, B : paucimannose et C : type hybride isolées de glycoprotéines de plantes (d'après Lerouge et al., 1998 et Melo et al., 1997).



**Figure 4 :** Structure de N-glycannes identifiées chez trois espèces d'insectes.



**Figure 5 :** Structures N-glycanniques originales identifiées chez deux espèces de nématodes (d'après Khoo et al., 1997).



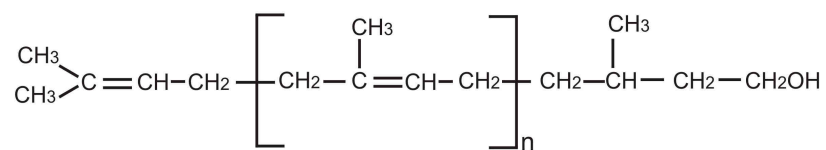
Les structures oligomannosidiques sont retrouvées chez tous les eucaryotes. Il apparaît cependant que chaque espèce étudiée possède un potentiel de glycosylation unique, reflété par la diversité des structures N-glycanniques hybrides ou complexes existantes. Néanmoins, la présence ubiquitaire du core pentasaccharidique illustre l'existence d'un schéma de biosynthèse commun, conservé au cours de l'évolution. En effet, la persistance d'un noyau commun en contraste avec l'extrême diversité structurale retrouvée sur la glycoprotéine mature coïncide clairement avec les différentes étapes de biosynthèse des N-glycannes.

### 3. Biosynthèse des N-glycannes

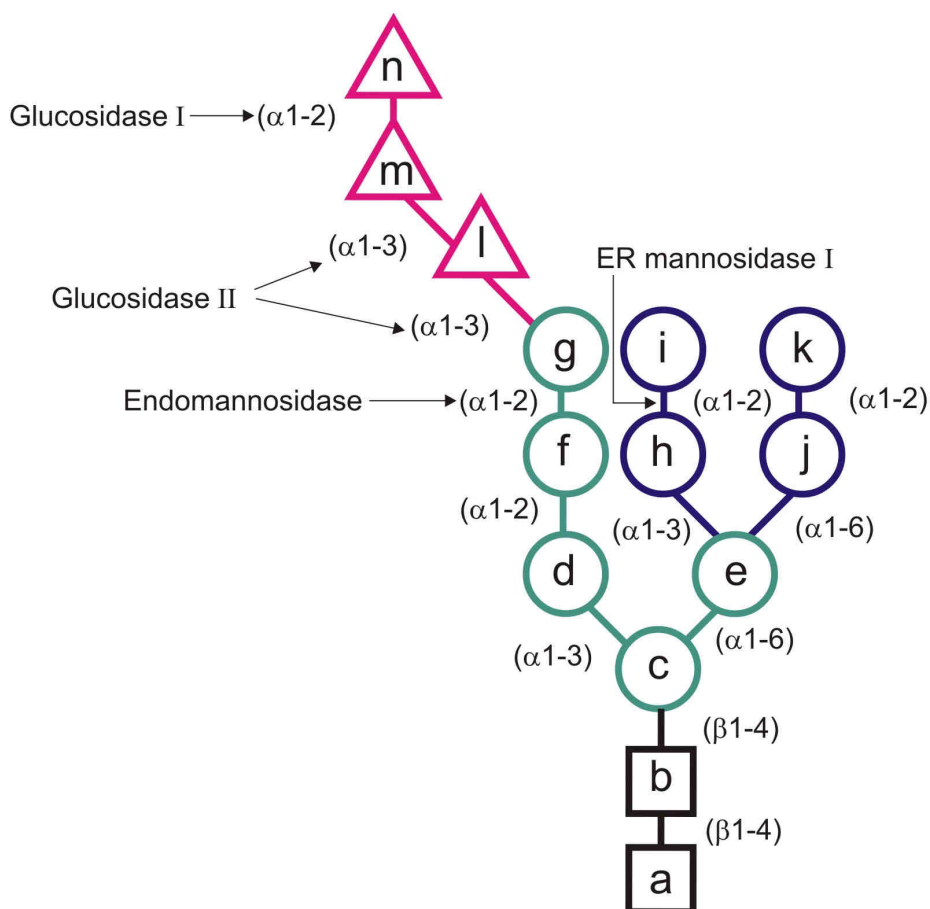
La biosynthèse d'un N-glycane s'effectue en plusieurs étapes : assemblage du précurseur oligosaccharidique, transfert, action de diverses glycosidases puis de glycosyltransférases. Ce processus est localisé à la fois dans le Réticulum Endoplasmique Rugueux (RER) et dans l'appareil de Golgi. Les étapes décrites ci-dessous correspondent à la biosynthèse des N-glycannes telle qu'elle se déroule classiquement dans une cellule de mammifères. L'étape princeps de la N-glycosylation est le transfert en bloc d'un tétradécasaccharide sur un résidu asparaginyll de la protéine naissante.

#### 3.1 Assemblage du précurseur oligosaccharidique : le cycle des dolichols

Le précurseur tétradécasaccharidique Glc<sub>3</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub> (Figure 7) est préassemblé sur un résidu polyisoprénique particulier, le dolichol (Figure 6), via une liaison pyrophosphate.

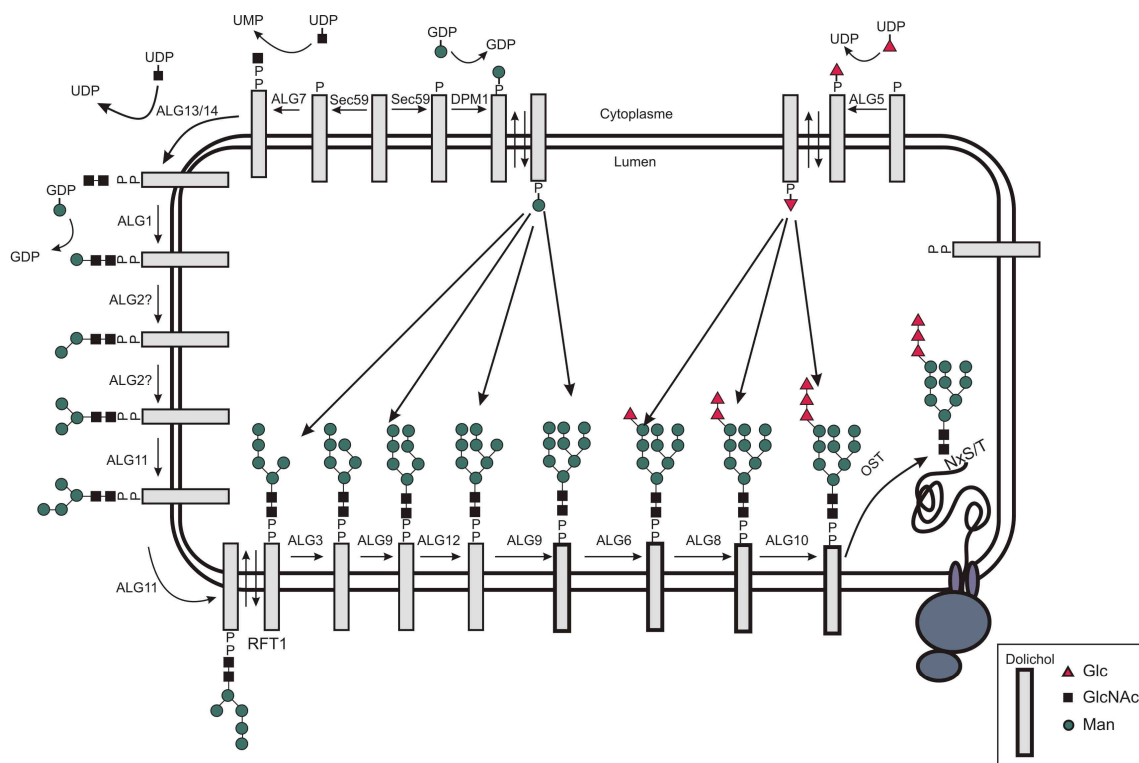


**Figure 6:** Structure du dolichol, *n* variant selon l'organisme considéré entre 11 et 22.



**Figure 7 :** Structure de l'oligosaccharide précurseur des N-glycannes. Ce tétradécasaccharide contient 3 glucoses (triangles), 9 mannoses (cercles) et 2 N-Acétyleglucosamines (carrés). Les lettres correspondent à l'ordre d'addition du monosaccharide lors de la biosynthèse du précurseur. Les résidus de mannose en vert ou en bleu diffèrent à la fois par la localisation de leur transfert et par le donneur impliqué (vert : face cytosolique, GDP-Man ; bleu : lumen, DolPMan). L'oligosaccharide entier correspond au précurseur synthétisé dans les cellules de mammifères, de plantes et de champignons. Les sites de clivage de quelques enzymes impliqués dans l'élagage sont indiqués.

Cet assemblage s'effectue dans le RER au cours d'un processus cyclique, le cycle des dolichols, impliquant l'action séquentielle de différentes glycosyltransférases, produits des gènes ALG (Helenius et Aebi, 2004). Les différentes étapes de cet assemblage sont schématisées dans la Figure 8.



**Figure 8 :** Le cycle des dolichols (d'après Helenius et Aebi, 2004 ; mise à jour Weerapana et Imperiali, 2006)

Dans un premier temps, le  $\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$  est formé par addition successive de  $\text{GlcNAc-1-P}$  sur le  $\text{P-Dol}$  (Figure 6 ; résidu a), puis de  $\text{GlcNAc}$  (b) sur le  $\text{GlcNAc-PP-Dol}$  ainsi formé. Les glycosyltransférases impliquées utilisent dans les deux cas le nucléotide sucre  $\text{UDP-GlcNAc}$  comme donneur. Ces premières réactions se déroulent sur la face cytoplasmique du RE. Les étapes suivantes consistent en l'addition de 9 résidus de mannose. Les cinq premiers (c,d,e,f,g) le sont à partir de  $\text{GDP-Man}$  en une suite de réactions se déroulant sur la face cytoplasmique. Les 4 derniers (h,i,j,k) s'ajoutant, au contraire, sur la face luminale après retournement de l'intermédiaire  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$  vers la face interne de la membrane. Les mannosyltransférases impliquées utilisent le  $\text{Man-P-Dol}$ , donneur synthétisé face cytoplasmique à partir de  $\text{GDP-Man}$  qui, étant donné son caractère hydrophobe, permet une réaction de transfert localisée dans la bicouche lipidique interne du RE (Kornfeld and Kornfeld, 1985).

De façon similaire, l'addition des trois derniers résidus de glucose se fait à partir de  $\text{Glc-P-Dol}$ , conduisant au produit final, le  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ . Une fois complet, le précurseur est transféré en bloc sur un résidu asparaginyll d'une protéine nouvellement synthétisée au sein de la séquence-consensus  $\text{Asn-X-Ser/Thr}$  ( $\text{X} \neq \text{Pro}$ ) : il s'agit d'un événement co-translationnel.

### ***3.2 Transfert du précurseur oligosaccharidique : le complexe de l'oligosaccharyl transférase (OST)***

*(Kelleher et Gillmore, 2007)*

Chez les mammifères comme chez la levure, l'addition des trois résidus de glucose confère à l'oligosaccharide précurseur une affinité plus grande pour l'oligosaccharyltransférase (OST) qui en fait son substrat préférentiel pour le transfert sur la protéine. Le résidu asparaginyll sur lequel se fait l'addition doit être dans un triplet-consensus: Asn-X-Ser/Thr (X étant un acide aminé différent de la proline). Si en général l'OST affiche une affinité particulière pour le précurseur  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ , celle-ci n'exclue cependant pas le transfert de précurseurs tronqués (Freeze et Aebi, 2005).

C'est à ce moment, une fois l'étape de transfert "en bloc" effectué, que le devenir de la glycoprotéine est défini : transfert vers l'appareil de Golgi, adressage vers le lysosome ou dégradation. C'est précisément dans l'appareil de Golgi que le précurseur oligosaccharidique subira les étapes indispensables de maturation à l'origine des structures oligomannosidiques, complexes ou hybrides.

### ***3.3 Le contrôle-qualité N-glycane-dépendant des protéines***

*(Parodi, 2000)*

Le propos ici n'est pas de détailler tous les acteurs impliqués dans la mise en conformation des glycoprotéines nouvellement synthétisées mais d'illustrer le rôle primordial joué par les N-glycannes dans l'assistance à la mise en conformation des glycoprotéines.

L'accès à l'appareil de Golgi est conditionné par divers signaux portés à la fois par la protéine et le glycane. Il s'agit pour la protéine de l'absence de séquence de rétention dans le réticulum endoplasmique. Concernant la partie glycanique, le départ vers le Golgi est conditionné par l'obtention d'une structure-clé  $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$  (structures A ou B, Figure 9). Cet accès au golgi peut être direct (action de l'endomannosidase) ou peut impliquer le contrôle-qualité N-glycane-dépendant des glycoprotéines (Figure 9).

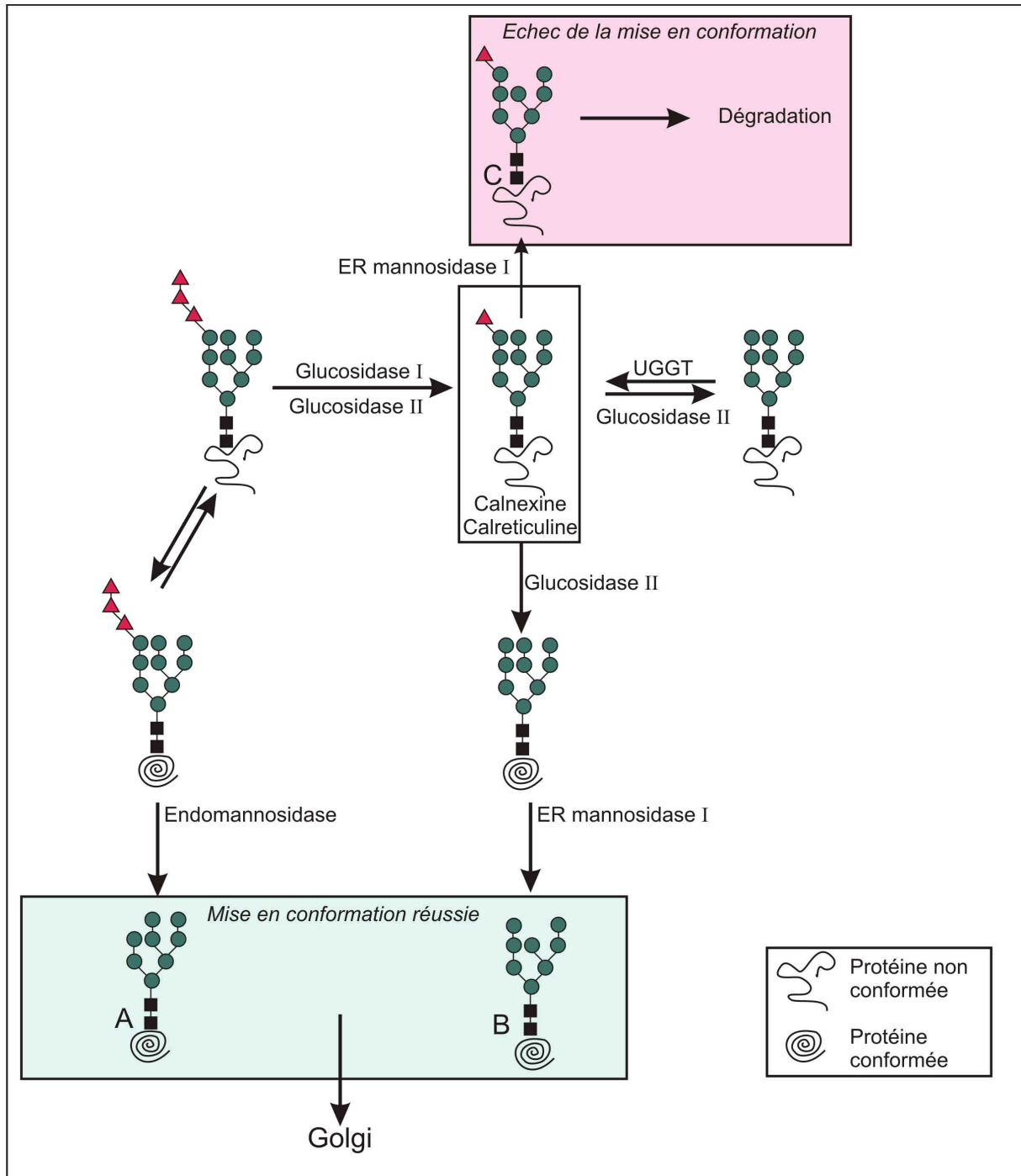
Immédiatement après transfert par l'OST du tétradéca-saccharide sur la protéine nouvellement synthétisée, le plus externe des trois glucoses (n) est éliminé par action de la glucosidase I ( $\alpha 1,2$  glucosidase). Peu de temps après, la glucosidase II ( $\alpha 1,3$  glucosidase) enlève le second glucose (m). Le N-glycane monoglucosylé ainsi généré présente une excellente affinité pour les chaperonines membranaires (calnexine) ou solubles

(calréticuline), affinité conservée tant que son glycanne porte ce dernier résidu de glucose lié en ( $\alpha$ 1,3). A cet égard, l'action d'une glycosyltransférase spécifique (UGGT : Unfolded Glycoprotein Glucosyl Transferase) sur les glycoprotéines mal conformées permet leur rétention transitoire dans le réticulum et favorise ainsi leur interaction avec des enzymes réticulaires telles que la peptidyl disulfo isomérase, ERp57 et ERp73, favorisant ainsi la mise en conformation. Si malgré cette assistance la protéine n'est toujours pas mise en conformation, elle est finalement dégradée.

### ***3.4 Obtention des structures hybrides ou complexes***

La diversification des *N*-glycannes de type oligomannosyl en un large répertoire de *N*-glycannes hybrides ou complexes résulte de l'action combinée de glycosyltransférases et glycosidases. L'élagage du précurseur *N*-glycannique commence dans le RE et se poursuit dans les différents saccules golgiens pour ne conserver de la structure initiale que l'heptasaccharide  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ .

Dans le cis Golgi, les glycoprotéines lysosomales subissent une phosphorylation spécifique des mannoses catalysée par deux enzymes, la *N*-acétylglucosaminylphosphotransférase et la *N*-acétylglucosamine-1-phosphodiester  $\alpha$ -*N*-acétylglucosaminidase : Man-6-phosphate signal d'adressage au lysosome (Figure 10, étapes I et II). Les structures oligomannosidiques des glycoprotéines non lysosomales peuvent être davantage élaguées par action d'une  $\alpha$ 1,2-mannosidase golgienne (Mannosidase golgienne I, Golgi cis ou médian) pour former la structure  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  (Figure 10, étape 5).



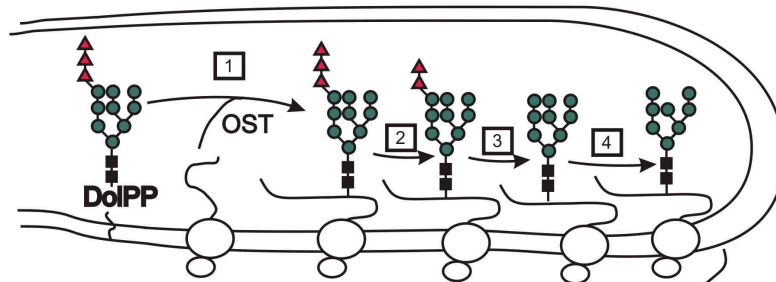
**Figure 9:** Elagage des N-glycannes et contrôle-qualité des N-glycoprotéines dans le réticulum endoplasmique.

Ensuite, dans le saccule médian, est ajouté sur cette structure un résidu N-acétylglucosamine catalysé par la N-acétylglucosaminyltransférase I (Figure 10, étape 6). Les chaînes oligosaccharidiques destinées à devenir des structures complexes sont davantage processées après cette addition suite à l'élimination de deux résidus de mannose par l' $\alpha$ -mannosidase II (Figure 10, étape 7) et l'addition sur le mannose libre d'un autre résidu de N-acétylglucosamine cette fois-ci catalysée par la N-acétylglucosaminyltransférase II (Figure 10, étape 8). Alors, les fucosyltransférases peuvent additionner un résidu de fucose sur le GlcNAc en position terminale réductrice du core (Figure 10, étape 9).

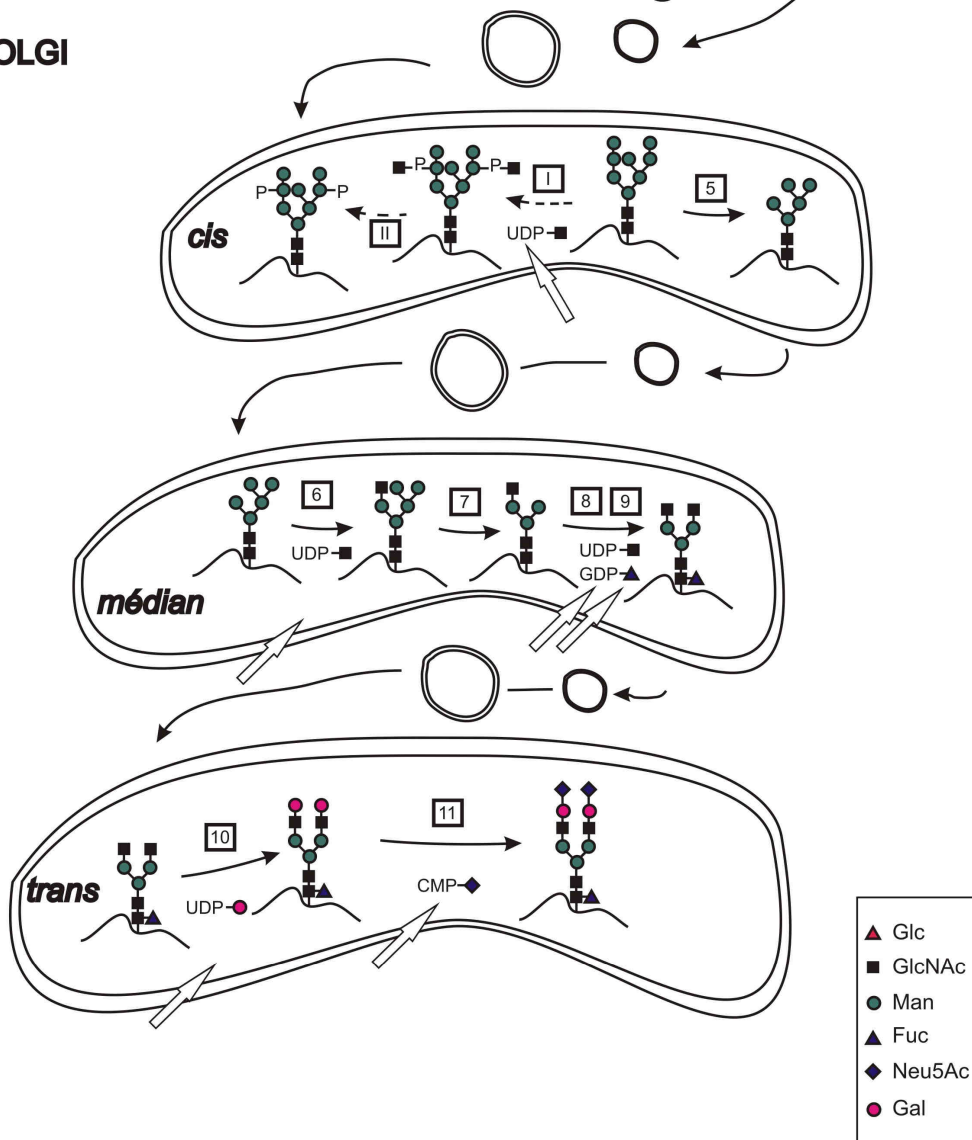
L'étape finale de la biosynthèse des oligosaccharides complexes se fait dans le trans golgi et consiste en l'addition de galactose et d'acide sialique catalysé par des galactosyl- et sialyl- transférases (Figure 10, étapes 10 et 11). La protéine nouvellement synthétisée sort alors du Golgi et est transportée à sa destination finale.

Evidemment, cette représentation ne constitue qu'un exemple parmi les nombreuses possibilités d'action séquentielle des glycosyltransférases golgiennes. L'addition de nombreuses antennes, de sucres terminaux et périphériques variés peut avoir lieu dans le médian ou trans Golgi. Les détails concernant l'action des glycosyltransférases impliquées dans le transfert de ces sucres terminaux, à l'origine de la diversité structurale observée sur les glycoprotéines ne sont pas développés ici. Le but étant d'exposer comment le respect strict d'un processus de biosynthèse et de maturation implique la conservation d'une structure minimale, commune à tout N-glycane, le noyau pentasaccharidique  $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ .

RER



GOLGI



**Figure 10:** Représentation schématique des processus d'élagage et de biosynthèse sur les N-glycoprotéines de mammifères nouvellement synthétisées au cours du trajet de la protéine dans la voie de sécrétion.



#### **4. Conservation du cycle des dolichols chez les eucaryotes**

La majorité des eucaryotes synthétisant des N-glycannes (champignons, plantes, animaux, moisissure rampante et euglènes) respectent le processus de N-glycosylation décrit ci-dessus. La conservation du core pentasaccharidique nous indique que chaque cellule eucaryote produisant des N-glycannes a conservé l'étape princeps, réticulaire, de la biosynthèse des N-glycannes : le cycle des dolichols. Si cette étape est conservée, le peu de données structurales disponibles concernant la N-glycosylation chez les protistes montre néanmoins que certains de ces organismes présentent des voies de biosynthèse originales, tronquées. Ces travaux indiquent ainsi que le transfert d'un précurseur unique, l'oligosaccharide  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ , n'a pas été strictement conservé au cours de l'évolution, et qu'il existe ainsi divers précurseurs oligosaccharidiques synthétisés et transférés (Castro *et al.*, 2006). La nature du précurseur synthétisé dépend directement du panel d'enzymes de type ALG présent dans un organisme. L'existence de domaines conservés au sein des enzymes de type ALG facilite leur recherche dans des banques de données. Ainsi, il est possible de prédire la nature du précurseur oligosaccharidique synthétisé par un organisme en déterminant les enzymes ALG qu'il possède. Ces prédictions ont été strictement vérifiées chez les eucaryotes supérieurs ainsi que chez les parasites libres (Samuelson *et al.*, 2005).

##### **4.1 Propriétés des glycosyltransférases de type ALG**

Les glycosyltransférases de type ALG sont des enzymes très particulières. Contrairement aux nombreuses glycosyltransférases golgiennes, elles sont monogéniques : à une fonction correspond un seul et unique gène et toute mutation se traduit directement par la perte d'activité. C'est d'ailleurs cette propriété qui a permis de les caractériser individuellement et d'élucider les différentes étapes du cycle des dolichols, *via* l'étude de mutants de levure (Helenius et Aebi, 2001). La topologie de ces glycosyltransférases est tout à fait caractéristique : elles possèdent 12 domaines transmembranaires et un domaine catalytique consistant en une boucle extramembranaire. Le séquençage de nombreux organismes a permis de vérifier l'extrême homologie existant entre les différentes enzymes de type ALG à travers les espèces, homologie facilitant la recherche systématique de ces enzymes au sein de bases de données génomiques ou protéiques. Finalement, les enzymes utilisant les Dol-P-sucres comme donneur, en l'occurrence les glycosyltransférases agissant

dans le lumen du RE, présentent une importante homologie avec les enzymes PIG impliquées dans la biosynthèse des ancras Glycosyl Phosphatidyl Inositol (GPI) (Oriol *et al.*, 2002).

#### ***4.2 Diversité des précurseurs oligosaccharidiques synthétisés***

Les informations structurales disponibles concernant la N-glycosylation chez les protistes suggèrent plusieurs exceptions notables au schéma de biosynthèse décrit chez la levure ou les Mammifères. L'oligosaccharide transféré varie en effet selon l'organisme considéré, comme le démontre les études précédentes concernant certains parasites libres tels que *Leishmania mexicana*, *Trypanosoma cruzii*, *Crithidia fasciculata* (Samuelson *et al.*, 2005; Kelleher *et al.*, 2007), qui transfèrent un oligosaccharide précurseur non glucosylé, ou par l'algue pluricellulaire *Volvox carteri* (Parodi, 1993 ; Yagodnik, 1987) qui transfère un précurseur Glc<sub>1</sub>Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>.

L'exploration de la nature des précurseurs oligosaccharidiques synthétisés chez divers organismes a permis de décrire de nouveaux oligosaccharides tout à fait originaux tels que GlcNAc<sub>2</sub>-P-P-Dol chez *Giardia lamblia*, chez *Trichomonas vaginalis* ou encore *Entamoeba histolytica* et *Cryptococcus neoformans*.

#### ***4.3 Propriétés de l'OST***

L'oligosaccharyltransférase est un complexe membranaire localisé dans l'espace luminal du RE et étroitement lié au translocon. C'est un complexe multimérique hétéroprotéique comprenant respectivement 7 ou 8 sous-unités si l'on considère respectivement les mammifères ou la levure (*Saccharomyces cerevisiae*). Chez la levure, sur 8 sous-unités, 5 sont essentielles à la viabilité cellulaire (Schwarz *et al.*, 2005 ; Knauer et Lehle, 1999). STT3p en fait partie et de nombreuses études la présente comme porteuse de la partie catalytique. On note d'ailleurs que chez les trypanosomatides, l'OST se résume à STT3 et que ces parasites présentent jusqu'à 4 isoformes de cette protéine (Kelleher et Gillmore, 2006).

Chez les eucaryotes supérieurs, le transfert préférentiel de l'oligosaccharide précurseur Glc<sub>3</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub> assure le contrôle-qualité des glycoprotéines nouvellement synthétisées mais aussi la conservation de l'uniformité des étapes d'élagage. Cependant, des études menées sur l'OST de levure et de vertébrés prouvent qu'elle est capable de transférer avec une affinité variable différents précurseurs oligosaccharidiques, et qu'en particulier le plus petit

donneur nécessaire au transfert est GlcNAc<sub>2</sub>-PP-Dol (Kelleher et Gillmore, 2006). Ainsi, les propriétés de l'OST ne limitent absolument pas le transfert d'un oligosaccharide tronqué.

*L'appréhension des profils de glycosylation chez des parasites intracellulaires obligatoires tels que Plasmodium falciparum, Toxoplasma gondii, Eimeria tenella, Encephalitozoon cuniculi, pourrait permettre de déterminer définitivement les structures qu'ils sont capables de synthétiser, et de vérifier les prédictions concernant la biosynthèse du précurseur lié au dolichyl-pyrophosphate. Une telle étude nécessite une analyse structurale fine, permettant de déterminer sans ambiguïté les profils de glycosylation de différents parasites intracellulaires.*

*Ainsi au cours de mes travaux je me suis attachée à l'étude du potentiel de glycosylation des parasites intracellulaires obligatoires que sont Toxoplasma gondii et les deux microsporidies Encephalitozoon cuniculi et Antonospora locustae.*

## **II - Premier modèle d'étude : les microsporidies *Encephalitozoon cuniculi* et *Antonospora locustae***

*En collaboration avec le Dr Vivarès et le Dr Méténier, équipe Parasitologie Moléculaire et Cellulaire, LBP, CNRS UMR 6023.*

### **1. Généralités**

Associées aux champignons, les microsporidies constituent un ensemble de plus de 1200 eucaryotes unicellulaires qui, comme les Apicomplexa, sont tous des parasites intracellulaires obligatoires. Les microsporidies sont considérées comme ayant dérivé des champignons et ayant rapidement évolué, réduisant leur génome à l'extrême (Keeling 2003; Thomarat *et al.* 2004). Une espèce particulière de microsporidie, *Encephalitozoon cuniculi*, figure dans l'étude de Samuelson et collaborateurs (Samuelson *et al.*, 2005). Son génome récemment séquencé et annoté, ne présente apparemment aucune des glycosyltransférases de type ALG, excepté la Dolichyl- phosphoryl mannose synthase, Dpm1, impliquée à la fois dans le processus de N-glycosylation, dans l'éventuelle synthèse des O-mannoprotéines ainsi que dans la production des ancres GPI .

Si *E. cuniculi* ne semble pas posséder les glycosyltransférases de type ALG, il semble cependant qu'elle possède un certains nombres d'enzymes majeures impliquées dans le processus d'O-mannosylation. Aussi, il est particulièrement intéressant d'appréhender les capacités de glycosylation chez cette microsporidie afin de vérifier la véracité des prédictions bioinformatiques. Nous avons également étudié le potentiel de glycosylation d'une microsporidie distante, *Antonospora locustae*, dont le génome est en cours de séquençage.

#### **1.1 Les microsporidies**

Le cycle de développement des microsporidies comprend toujours une phase d'invasion, suivie d'une phase proliférative (mérogonie) puis d'une phase de différenciation (sporogonie) produisant de petits spores, support de la transmission, qui peuvent être libérés dans l'environnement. Les spores sont entourées d'une paroi cellulaire très résistante, riche en chitine. Elles possèdent un long filament, enroulé en spirale, dit filament polaire ou tube polaire, dont l'extrusion brutale permet l'inoculation du matériel sporoplasmique infectieux au sein d'une nouvelle cellule-hôte (Xu et Weiss, 2005).

Plusieurs espèces de microsporidies ont récemment émergé en tant que pathogène opportuniste chez l'Homme, notamment chez des patients immunodéprimés (Weiss, 2001). La physiologie ainsi que la biochimie des microsporidies est faiblement documentée, même si elle tend aujourd'hui à augmenter suite au séquençage du génome de l'une d'entre elles, *Encephalitozoon cuniculi*.

### ***1.1.1 Encephalitozoon cuniculi***

*E. cuniculi* s'impose comme un modèle d'étude des microsporidies. En effet, *E. cuniculi* est la première microsporidie mise en culture et c'est de toute évidence la mieux documentée au niveau moléculaire (Vivarès *et al.*, 2002). Cette microsporidie peut infecter un grand nombre de mammifères, en particuliers les rongeurs. Le parasite provoque des granulomes cérébraux et cause des infections chroniques. Elle s'est récemment révélée en tant qu'opportuniste émergent chez l'Homme, entraînant hépatites et conjonctivites, particulièrement dangereux pour les personnes immunodéprimées. *E. cuniculi* est un organisme monocaryotique dont le séquençage complet a révélé un génome très compact de 2,9 Mbases, constituant l'un des génomes eucaryotes les plus petits connus à ce jour (Katinka *et al.*, 2001). Les gènes impliqués dans le cycle de Krebs et la chaîne respiratoire sont manquants, et cet organisme présente peu de gènes impliqués dans la biosynthèse des acides aminés ainsi que plusieurs délétions dans les gènes codant les ARN ribosomiaux (Texier *et al.*, 2005). Toutes les enzymes de type ALG, liées à la N-glycosylation semblent absentes, prédisant l'absence totale de N-glycannes (Katinka *et al.*, 2001; confirmé par Samuelson *et al.*, 2005). En revanche, la présence de la Dolichyl Phosphate mannose transférase 1 (Dpm1) ainsi que de deux Protein Mannosyl Transférase (PMT) distinctes indique l'existence probable d'une voie de O-mannosylation. La présence de quelques enzymes impliquées dans la biosynthèse des ancres GPI a également été soulevée (Katinka *et al.*, 2001; Vivarès and Méténier, 2001).

### 1.1.2 *Antonospora locustae*

Nous nous sommes également intéressés à une autre espèce de microsporidie, phylogénétiquement distante d'*E. cuniculi*, *Antonospora locustae*, dont le séquençage est en cours : Antonospora locustae Genome Project, Marine Biological Laboratory at Woods hole, <http://gmod.mbl.edu/perl/site/antonospora01>

Anciennement appelée *Nosema locustae*, cette microsporidie diplocaryotique (binuclée) a été isolée originellement du criquet migrateur africain. Son spectre d'hôte a été évalué à une centaine d'espèces d'insectes incluant principalement des Lépidoptères, Diptères et Coléoptères (Lomer *et al.*, 2001). Elle est utilisée comme insecticide et sert au contrôle biologique d'insectes agricoles comme les criquets ou les sauterelles.

## 1.2 La glycosylation chez les microsporidies

Il existe très peu de données concernant les glycoconjugués chez les microsporidies, de même que sur les métabolismes impliqués dans les processus de glycosylation. La chitine apparaît comme le seul polysaccharide, son accumulation en une épaisse couche de la paroi sporale contribue à la rigidité de la spore (Bigliardi *et al.*, 1996 ; Vavra et Larson, 1999).

La présence de glycoconjugués a été révélée cytochimiquement dans trois types de structures sporales : l'exospore, le capuchon polaire et le tube polaire (Desportes-livage, 1996). Aucune structure n'a été décrite, les informations biochimiques concernant la présence de glycoconjugués chez les microsporidies dérivent principalement de la reconnaissance par des lectines particulières. Des extraits de spores de *Glugea plecoglossi* ont été soumis à huit différents types de lectines, démontrant que seule la ConA (concanavalin A) et la WGA (wheat germ agglutinin) réagissaient avec certaines glycoprotéines (Kim *et al.*, 1999). Chez *Encephalitozoon intestinalis*, deux protéines de la paroi cellulaire externe (exospore) sont supposées N-glycosylées du fait de leur détection par des anticorps spécifiques dans des fractions de lysats cellulaires retenues sur des billes de sépharose couplées à la ConA ou WGA (Hayman *et al.*, 2001). On note également la mise en évidence de structures O-mannosylées sur la protéine PTP1 (polar tube protein 1) d'*E. hellem* (Xu *et al.*, 2004).

*Les microsporidies sont des parasites intracellulaires obligatoires, chez lesquels la glycosylation joue toujours un rôle crucial dans les processus d'invasion. Mais avant tout, ces organismes dérivent des champignons. L'étude de levures modèles offre une variété d'approches biologiques, génétiques et moléculaires qui ont permis la caractérisation des voies de glycosylation.*

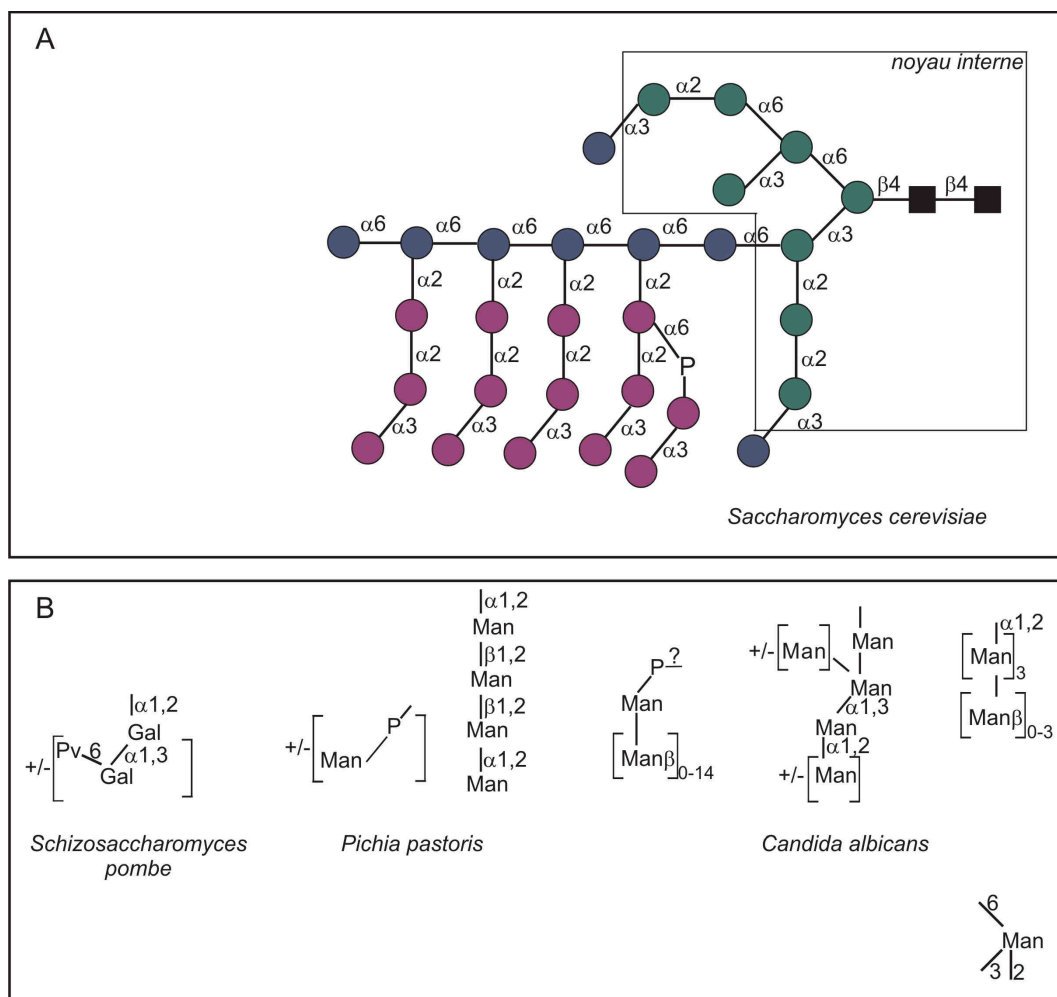
### **1.3 Glycosylation chez les levures**

Les levures présentent trois types de glycoconjugués, les N-glycoprotéines, les O-mannosylprotéines et des protéines présentant des ancres GPI (Lipke et Ovalle, 1988). Toutes ces structures sont impliquées dans la formation de la paroi extracellulaire. En effet, cette paroi extracellulaire est constituée à 90% de polysaccharides (mannoprotéines,  $\alpha$ - ou  $\beta$ -glucan, chitine). Les mannosylprotéines ou mannanes constituent la couche externe de la paroi extra-cellulaire (5 à 90 % de la partie glucidique) (Bacon, 1981). Ces mannosylprotéines sont des polypeptides extrêmement glycosylés, les structures glycaniques constituant généralement de 50 à 95% de leur poids. La plupart portent plusieurs N-glycannes de très grande taille, qui peuvent conférer une masse supplémentaire de 50,000 à 100,000 Da à la protéine. La O-mannosylation ainsi que l'addition d'ancres GPI, permettant l'ancrage des mannosylprotéines dans la paroi cellulaire, sont essentielles. Des mutations dans les voies de O-mannosylation ainsi que dans la biosynthèse des ancres GPI causent d'importants défauts de formation de la paroi cellulaire (Orlean, 1997).

#### ***1.3.1 La N-glycosylation***

Les étapes initiales, réticulaires, de la N-glycosylation sont communes à celles de la plupart des eucaryotes. Seulement, après transfert sur la protéine, l'élagage de l'oligosaccharide précurseur  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  se résume à l'action de glucosidases et de la mannosidase réticulaire à l'origine du noyau interne  $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$  (Figure 11). Ce noyau interne, une fois la glycoprotéine transférée vers l'appareil de Golgi, peut subir une extension par le transfert de mannoses additionnels liés en ( $\alpha$ 1-6), menant à un noyau externe comprenant de 8 à 15 résidu de mannose (noyau interne + résidus de mannose en bleu). Finalement, chacun des mannoses liés en ( $\alpha$ 1,6) peut porter une branche en ( $\alpha$ 1,2) ou ( $\alpha$ 1,3), résultat de l'action de mannosyltransférases spécifiques. On note également la possibilité d'addition de Man-1-P en position 6 d'un Man ( $\alpha$ 1-3). La figure 11 présente une des

innombrables possibilités de structures de type mannane chez *S. cerevisiae*. Les chaînes latérales, branchées sur les Man ( $\alpha 1,6$ ), peuvent varier énormément en fonction de l'espèce considérée. Chez certaines espèces, elles consistent en des chaînes de Man $\alpha(1,2)$ , coiffées (*S. cerevisiae*) ou non (*Pichia pastoris*) de Man $\alpha(1,3)$  alors que chez d'autres espèces, certaines branches peuvent être allongées par du Gal  $\alpha(1,2)$  coiffé par du Gal  $\alpha(1,3)$  portant du pyruvate (*S. pombe*). Par ailleurs, les chaînes latérales peuvent être ramifiées par addition de groupements phosphates. En particulier, chez *Candida albicans*, l'addition de poly- $\beta$ -Man via un groupement phosphate semble impliquée dans la virulence. Les N-glycannes de levures varient énormément dans leurs liaisons, dans la composition des chaînes latérales, et dans leur taille. Si certaines branches ne sont constituées que d'un résidu de Gal, d'autres constituent d'énormes chaînes polymannosylées, éventuellement ramifiées par une partie acido-labile, initiée par l'addition de groupements phosphates.



**Figure 11:** N-glycosylation chez les levures (d'après Gemmill et Trimble, 1999). Pv : pyruvate ; P : phosphate.

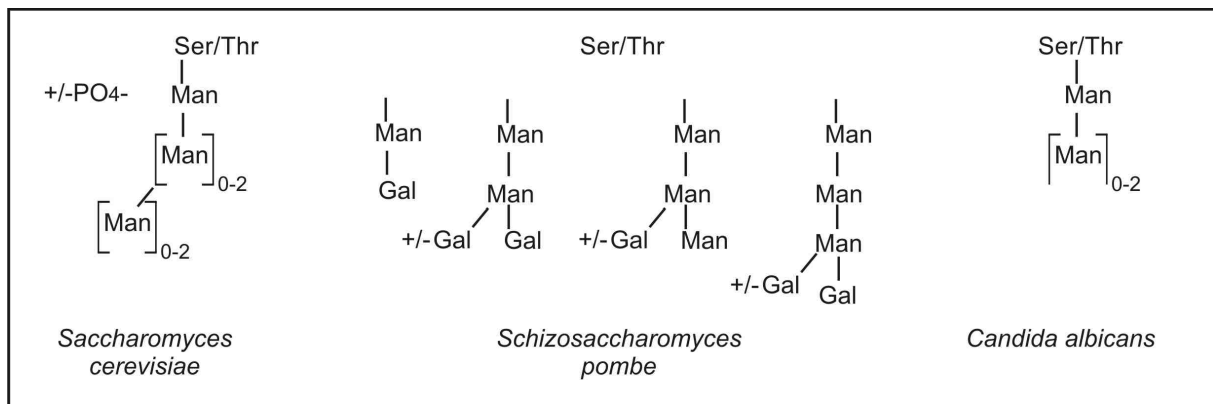


### 1.3.2 La O-mannosylation

La O-mannosylation est la seule forme de structure glycanne O-liée décrite chez la levure. Les sites de O-mannosylation sont souvent réunis dans des séquences particulière des mannoprotéines, riches en Ser et Thr (Van der Vaart *et al.*, 1995).

Comme la N-glycosylation, l'initiation de la O-mannosylation se fait dans le RE par addition du premier mannose par action d'une famille d'enzymes, les Phospho-Mannose Transférases (PMT). Cette famille a été caractérisée sur la base de la première Dol-P-Man protéine O-mannosyltransférase, identifiée chez *S. cerevisiae* (Strahl-Bolsinger *et al.*, 1999). Un défaut de O-mannosylation entraîne un défaut de formation de la paroi cellulaire, néfaste la viabilité cellulaire. D'ailleurs, chez *S. cerevisiae*, un *knock-out* de la Dol-P-Man synthase Dpm1 est létal (Orlean *et al.*, 1990). Chez les divers champignons étudiés, le mannose de l'extrémité terminale réductrice est toujours lié en  $\alpha$  sur une Ser ou Thr.

L'élongation du glycanne se poursuit ensuite dans l'appareil de Golgi, le GDP-Man ou l'UDP-Gal servant alors de donneur pour l'élongation de l'oligosaccharide.



**Figure 12** : O-mannosylation chez les levures (D'après Gemmill et Trimble, 1999).

Comme pour les N-glycannes, les structures synthétisées varient selon l'espèce considérée (Figure 12). *S. cerevisiae* se distingue par l'addition de Man( $\alpha$ 1,3) pour donner lieu à de courtes structures mannosylées, éventuellement substituées par des groupements phosphates. *Candida albicans* et *Pichia pastoris* ne transfèrent que des Man liés en ( $\alpha$ 1,2), formant des chaînes de taille variable. *S. pombe* se caractérise par l'attachement d'un ou deux résidus de Gal, conduisant à l'éventuelle obtention d'oligosaccharides ramifiés.

### ***1.3.3 La glypiation ou ancrage GPI***

La glypiation consiste en l'addition dans le RE d'un groupement glycosylphosphatidylinositol (GPI) à son extrémité C terminale. L'insertion de la partie phosphatidylinositol, substitué par des diacylglycérol, dans la bicouche phospholipidique externe de la membrane cellulaire assure un ancrage stable de la protéine à cette membrane. Deux glycoprotéines de levure particulièrement abondantes présentent des ancres GPI (Conzelmann *et al.*, 1992). Les structures des ancres de GPI de levure sont similaires à celles observées chez les autres eucaryotes. Les ancres GPIs partagent un noyau commun éthanolamine-PO<sub>4</sub>-6-Man(α1,2)Man(α1,6)Man(α1,4)GlcNH<sub>2</sub>(α1,6)-inositol-1-PO<sub>4</sub>-lipide.

L'ancre GPI est attachée à l'extrémité C terminale de la protéine par une liaison amide *via* le groupement amine de la phosphoéthanolamine. Classiquement chez les eucaryotes supérieurs, le groupement phosphatidylinositol est substitué par des résidus de diacylglycérol. Chez la levure, il peut également être substitué par un résidu de céramide (Conzelmann *et al.*, 1992). La voie de biosynthèse des GPI chez la levure *S. cerevisiae* a été caractérisée, elle est similaire à celle décrite chez les eucaryotes supérieurs (Orlean, 1990 ; Costello et Orlean, 1992).

*Les microsporidies sont des parasites intracellulaires obligatoires dérivant des champignons. Chez les levures, la glycosylation est essentielle pour la viabilité car nécessaire à la croissance et la multiplication cellulaire. De plus, les glycoconjugués confèrent à la paroi sporale la rigidité nécessaire à la protection de la levure en cas de privation de nutriment ou dans des conditions défavorables (Strahl-Bolsinger et al., 1999). Finalement, il est établi que la paroi végétative de certaines levures pathogènes, telle que Candida albicans présentent des glycoconjugués particuliers, pleinement impliqués dans l'adhésion cellulaire et la modulation de la réponse immunitaire de l'hôte (Chaffin et al., 1998).*

*Les données structurales concernant la présence de glycoconjugués chez les microsporidies ainsi que leur éventuelle implication dans la pathogénicité de ces microorganismes sont quasi inexistantes. L'obtention récente de la séquence complète du génome d'Encephalitozoon cuniculi a révélé l'absence de toutes les glycosyltransférases ALG ainsi que la présence d'enzymes potentiellement impliquées dans une voie de O-mannosylation. L'établissement du profil de glycosylation de E.cuniculi permettra de vérifier les éventuelles présence ou absence de voies de glycosylation fonctionnelles (N-glycosylation*

ou O-mannosylation). Par ailleurs, nous pourrions vérifier si ces observations s'appliquent également à *A. locustae*, dont le génome est en cours de séquençage.

## **2. Résultats**

Les travaux effectués dans le cadre de notre collaboration avec l'équipe du Dr Vivarès sont résumés dans l'article suivant, publié en 2006 dans *Glycobiology*, intitulé : *Major O-glycans in the spores of two microsporidian parasites are represented by unbranched manno-oligosaccharides containing  $\alpha$ -1,2 linkages.*

## Major O-glycans in the spores of two microsporidian parasites are represented by unbranched manno-oligosaccharides containing $\alpha$ -1,2 linkages

Vanessa Taupin<sup>2</sup>, Estelle Garenaux<sup>3</sup>, Muriel Mazet<sup>2</sup>, Emmanuel Maes<sup>3</sup>, Hubert Denise<sup>2</sup>, Gérard Prensier<sup>2</sup>, Christian P. Vivarès<sup>1,2</sup>, Yann Guérardel<sup>3</sup>, and Guy Méténier<sup>2</sup>

<sup>2</sup>Equipe Parasitologie Moléculaire et Cellulaire, LBP, CNRS UMR6023, Université Blaise Pascal, 24 Avenue des Landais, 63177 Aubière Cedex, France; and <sup>3</sup>Laboratoire de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, CNRS UMR8576, Université des Sciences et Technologies de Lille, F-59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

Received on July 12, 2006; revised on September 8, 2006; accepted on September 11, 2006

**Protein glycosylation in microsporidia, a fungi-related group comprising exclusively obligate intracellular parasitic species, is still poorly documented. Here, we have studied glycoconjugate localization and glycan structures in spores of *Encephalitozoon cuniculi* and *Antonosporea locustae*, two distantly related microsporidians invading mammalian and insect hosts, respectively. The polar sac-anchoring disc complex or polar cap, an apical element of the sporal invasion apparatus, was strongly periodic acid-thiocarbohydrazide-Ag proteinate-positive. Mannose-binding lectins reacted with the polar cap and recognized several bands (from 20 to 160 kDa) on blots of *E. cuniculi* protein extracts. Physicochemical analyses provided the first determination of major glycostructures in microsporidia. O-linked glycans were demonstrated to be linear manno-oligosaccharides containing up to eight  $\alpha$ 1,2-linked mannose residues, thus resembling those reported in some fungi such as *Candida albicans*. No N-linked glycans were detected. The data are in accordance with gene-based prediction of a minimal O-mannosylation pathway. Further identification of individual mannoproteins should help in the understanding of spore germination mechanism and host–microsporidia interactions.**

**Keywords:** glycan analysis/microsporidia/O-mannosylation/polar cap/ultracytochemistry

### Introduction

The identification of glycans and glycoconjugates in eukaryotic parasites is of interest for the knowledge of host–parasite interactions and pathogenic determinants (Guha-Niyogi et al. 2001). It is worth noting that the capacity of classical O-linked and N-linked glycosylations can be highly reduced in some species exhibiting an obligate intracellular lifestyle. This is the case of the apicomplexan parasite *Plasmodium falciparum* (malaria agent) in which the most abundant

glycoconjugate structures are glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchors (Gowda et al. 1997). Bioinformatic analysis of the *P. falciparum* genome sequence revealed only four potential enzymes of the N-glycosylation pathway and no enzyme characteristic of the synthesis of complex O-linked glycans (Aravind et al. 2003).

Relatively little is known about carbohydrate diversity and glycosylation processes in microsporidia, an assemblage of over 1200 unicellular eukaryotic species that are all obligate intracellular parasites. These organisms are viewed as highly derived fungi having undergone rapid reductive evolution (Keeling 2003; Thomarat et al. 2004). Several species are human pathogens and may cause severe diseases in immunodeficient patients (Weiss 2001). Their development inside host cells comprises a proliferation phase (merogony) followed by a differentiation phase (sporogony) producing small spores that can be released in the environment. Surrounded by a resistant cell wall, the microsporidian spore contains a very long coiled organelle (polar tube) that plays an essential role in the onset of cell invasion. Indeed, the polar tube can be quickly extruded at the apical pole of the spore in order to inject the sporoplasm into a new host cell (Xu and Weiss 2005).

Chitin appears as the unique microsporidian polysaccharide and is associated with the thick inner layer of the spore wall, named the endospore (Bigliardi et al. 1996; Vavra and Larson 1999). Glycoconjugates should be abundant in a periodic acid-Schiff (PAS)-positive apical region of the spore, called the “polar sac-anchoring disc complex” or “polar cap”, that comprises a dome-shaped vesicular structure closely associated with a discoid element capping the anterior end of the polar tube (Vavra and Larson 1999). Current biochemical information about microsporidian glycoproteins mainly derives from lectin-binding experiments. Blotting of *Glugea plecoglossi* spore extracts with eight different lectins showed that only concanavalin A (ConA) and wheat germ agglutinin (WGA) react with some protein bands (Kim et al. 1999). In *Encephalitozoon intestinalis*, two proteins of the outer spore wall layer (exospore) were assumed to be N-glycosylated on the only basis of their detection with specific antibodies in the fractions of infected cell lysates that were immobilized on either ConA or WGA-coated agarose beads (Hayman et al. 2001). In contrast, purified *E. hellem* polar tube protein (PTP) 1 should be O-mannosylated because of its lack of reactivity with an antibody to O-GlcNAc, its binding to only ConA among 10 different lectins, and elimination of this binding by NaOH treatment (Xu et al. 2004). The occurrence of O-mannosylation is more in agreement with annotation data for the genome sequence of the closely related species *E. cuniculi* (Katinka et al. 2001; Vivarès and Méténier 2004).

<sup>1</sup>To whom correspondence should be addressed; Tel: +33 4 73 40 74 57; Fax: +33 4 73 40 76 70; e-mail: christian.vivares@univ-bpclermont.fr

In this article, we report on the localization and structure of mannoconjugates in spores of the microsporidians *E. cuniculi* and *Antonospora locustae*. Labeling with mannose-specific lectins at the electron microscope (EM) level suggested that the polar cap is a major site for mannose-rich glycoproteins. Analyses of glycan fractions with mass spectrometry (MS) and nuclear magnetic resonance (NMR) techniques led to the first determination of oligosaccharide structures linked to microsporidial proteins.

## Results

Our primary choice of *E. cuniculi*, a monokaryotic (mononucleate) microsporidian that infects a wide range of mammals, including humans, was justified by the extreme reduction of its genome (2.9 Mbp) that was fully sequenced (Katinka et al. 2001) and viewed as a model of “minimal genome” in eukaryotic cells (Méténier and Vivarès 2004). For comparison, analyses were also performed in the diplo-karyotic (binucleate) species *A. locustae* that invades grasshoppers and locusts and has a 5.3-Mbp genome for which a sequencing project is in progress (<http://gmod.mbl.edu/perl/site/antonospora01>; *Antonospora locustae* Genome Project, Marine Biological Laboratory at Woods Hole, funded by NSF award number 0135272).

### *Reactivity of spore structures to PATAg and mannose-binding lectins*

An adaptation of the PAS reaction to the EM localization of polysaccharides and glycoconjugates, known as the periodic acid-thiocarbohydrazide-Ag proteinate (PATAg) reaction (Thiéry 1967), was applied to ultrathin sections of epoxy resin-embedded *E. cuniculi* spores. A strongly labeled structure was a cup-shaped organelle, named the polar cap, close to the spore apex and abutting the anterior end of the polar tube (Figure 1A). Another PATAg-positive region was the lamellar polaroplast, a tightly folded membrane system that represents the precursor of the new plasma membrane surrounding the sporoplasm when transferred into a host cell. The reactivity of the spore envelope and polar tube was rather low. Interestingly, a section through a germinated spore (with extruded polar tube) revealed that the reactive material of the polar cap forms a collar-like structure around the aperture required for the passage of the polar tube (Figure 1B). Moreover, a significant labeling was associated with the surface of the extruded polar tube. The carbohydrate richness of the polar cap was also evident when applying the PATAg test to ultrathin frozen sections of spores from both *A. locustae* (Figure 1C) and *E. cuniculi* (data not shown).

The EM localization of potential mannoconjugates in *E. cuniculi* cells was investigated by treatment of cryosections with two biotinylated mannose-binding lectins [ConA and *Galanthus nivalis* agglutinin (GNA)] followed by immunogold detection. ConA labeling was associated with polar tube coils located in the posterior region of the spore (Figure 2A). In the anterior region, both the polar tube straight part and the polar cap were ConA-reactive (Figure 2B). The main GNA-labeled spore structure was the polar cap (Figure 2C), as previously found with PATAg reaction. A few images were obtained for sporoblasts, the precursor cells in which the biogenesis of the extrusion apparatus occurs. Gold

particles were clustered in a more or less central cytoplasmic area consisting of small vesicles and extending close to a tubular network characteristic of polar tube formation (Figure 2D). These vesicles possibly derive from the nondictyosomal Golgi apparatus that remains difficult to identify only on the basis of morphological criteria. The same labeling pattern was observed in *A. locustae* cells (data not shown).

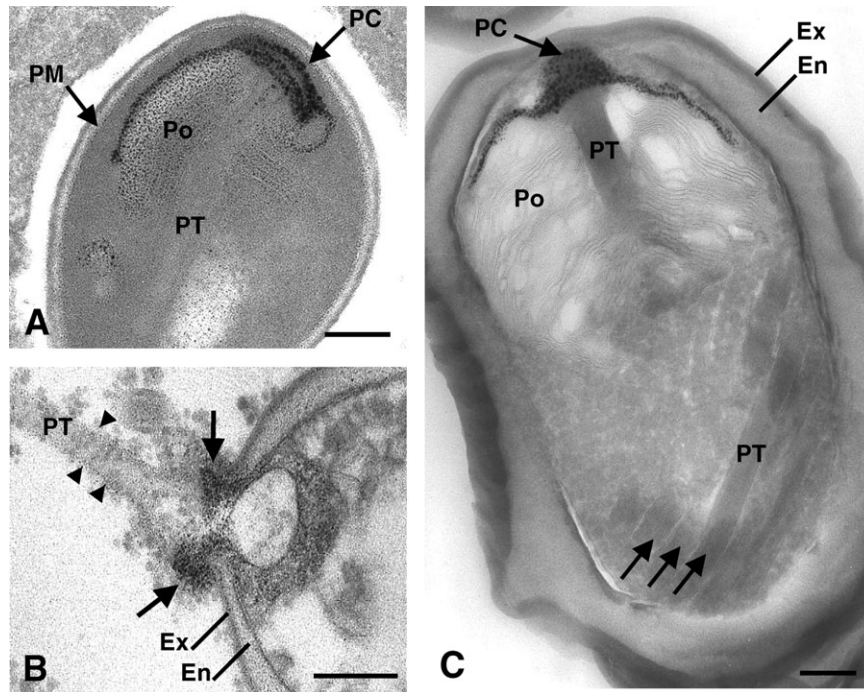
### *Detection of E. cuniculi glycoproteins on electrophoretic profiles*

The spore proteome of *E. cuniculi* has been recently investigated using two-dimensional (2-D) electrophoresis and MS techniques, leading to sequence characterization of 177 protein spots (Brosson et al. 2006). In a first attempt to detect glycoproteins in 2-D profiles, gels (pI range: 3–10) were either stained with Coomassie blue (Figure 3A) or blotted for further staining with a PAS-derived procedure involving sugar biotinylation (Figure 3B). A low number of reactive spots were observed. A poorly resolved acidic region was centered on 55 kDa and correlated with a group of 10 different proteins. Two of these proteins are known to be specifically secreted during sporogony: PTP1 (Delbac, Peyret, et al. 1998) and exospore protein spore wall protein (SWP) (Bohne et al. 2000). No sequence assignment was available for other glycoprotein spots, mainly seen between 30 and 35 kDa at neutral pI and in a 110-kDa basic region.

The presence of mannose-containing glycoproteins was tested by ConA and GNA blotting after sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of spore protein extracts. Because of their highly resistant cell wall, *E. cuniculi* spores were subjected to two different extraction procedures: one based on the combined action of urea and a disulfide-reducing agent [dithiothreitol (DTT)] and the other involving hot SDS treatment. Although protein patterns of the two kinds of extracts were significantly different, ConA and GNA reacted with some common bands in the two profiles: two bands at 38 and 55 kDa and least two other bands smearing between 100 and 160 kDa (Figure 4). In SDS extracts, a 65-kDa band and a doublet close to 20 kDa were also recognized by the two lectins. Ovalbumin preincubation prevented lectin binding for all bands (data not shown). Thus, in accordance with our previous ultracytochemical data, some microsporidial spore proteins should be mannosylated. Subsequent physicochemical studies were oriented toward the characterization of glycan structures.

### *N-glycans are virtually absent in peptide N-glycosidase-digested fractions*

Potential *N*- and *O*-linked glycans were purified from total delipidated extracts by sequential enzymatic digestions with peptide *N*-glycosidase F (PNGase F) and peptide *N*-glycosidase A (PNGase A), followed by reductive  $\beta$ -elimination. Separation of released glycans from remaining glycopeptides was achieved between each step by passage through C-18 columns, which was shown to permit collection of *N*- and *O*-linked glycans from a single sample (Dell et al. 1994). Both PNGase F and A, with different substrate specificities depending on the presence of fucose residue on chitobiose core, were used to release both possible types of *N*-glycans. Each of the three glycan fractions was tested for



**Fig. 1.** EM localization of glycoconjugates with PATAg reaction in microsporidian spores. [(A) and (B)] Epoxy resin sections of *E. cuciculi* spores. (A) Strong reactivity of the polar cap (PC) overlying the lamellar polaroplast (Po) and anterior straight part of the polar tube (PT). Polaroplast and plasma membrane (PM) are moderately labeled. (B) Section across a germinated spore focussing on the apical aperture surrounded by PATAg-positive material (arrows) originating from the PC. Note also the reactivity of the surface of the extruded polar tube (arrowheads). (C) Cryosection of *A. locustae* spore. PC labeling is evident. Arrows indicate several coils of the polar tube. Ex, exospore; En, endospore. Bar, 200 nm.

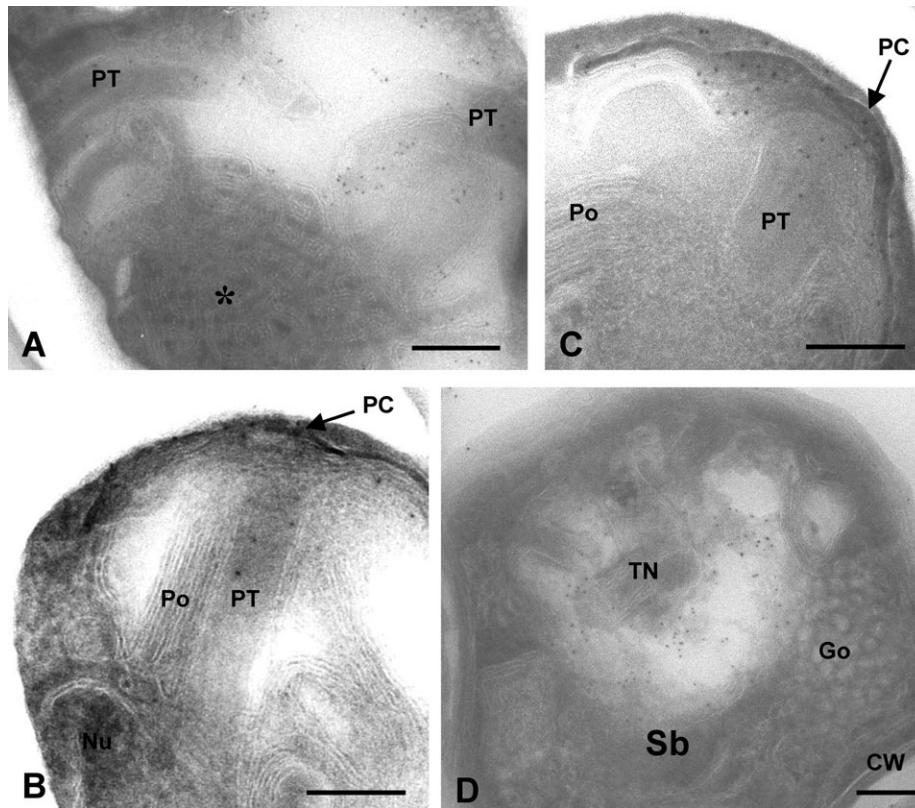
its monosaccharide composition in gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC–MS) and MS-analyzed as permethylated derivatives. This strategy repetitively failed to conclusively demonstrate the presence of *N*-linked glycans in several batches of spores from both *E. cuciculi* and *A. locustae*. Composition analysis of PNGase-digested products did not show the presence of GlcNAc and Man residues in significant amounts to be attributed to *N*-linked glycans. Accordingly, MS analyses of these fractions in native forms, or after permethylation, did not show any signal due to potential *N*-glycans. We conclude that either endogenous *N*-glycans were absent or, if present, the quantities were too low to be detected by physicochemical means. As expected, *N*-glycans were found in mammalian Madin–Darby canine kidney (MDCK) cells used for our *E. cuciculi* cultures after application of the same purification protocol and matrix assisted-laser desorption/ionization time of flight (MALDI-TOF) MS.

#### *O*-glycans are linear mannosylated oligosaccharides

Composition analyses established that mannose is the major monosaccharide component of *O*-linked glycan fractions (at least 70%). In order to facilitate further analysis, *O*-glycan fractions were separated into two subfractions (flow through subfraction and included subfraction) by gel filtration on a Bio-Gel P2 column. These subfractions were then permethylated and subjected to MALDI-TOF and electro-spray (ES)-ion trap MS analyses. In all experiments involving permethylated products, CD<sub>3</sub>I was used as primary permethylation reagent to detect natural monosaccharides

modified by methyl groups, as found in various organisms (Kocharova et al. 2000; Guerardel et al. 2001). The MALDI-TOF MS spectrum of permethylated flow through *O*-glycan fraction from *E. cuciculi* revealed a set of ions ranging from *m/z* 947 to *m/z* 1799 (Figure 5A). Their calculated compositions correspond to sodium adducts of permethylated-reduced tetra-hexosides (Hex<sub>4</sub>-ol) to octa-hexosides (Hex<sub>8</sub>-ol). The absence of [M-3+Na]<sup>+</sup> or [M-6+Na]<sup>+</sup> clearly demonstrated the absence of natural mono- or di-methylated hexose residues within the detected oligosaccharides. MS analysis of the gel filtration included fraction of *O*-glycans and showed only two [M+Na]<sup>+</sup> ions, at *m/z* 520 and 733, attributed to smaller reduced di- and tri-hexosides (data not shown).

The nature of all oligosaccharides was confirmed by collision-induced decay tandem mass spectrometry (CID-MS/MS) analysis of all [M+Na]<sup>+</sup> ions detected by MALDI-TOF MS. For ions at *m/z* 1373 and 1586, fragmentation patterns of all compounds were consistent with the presence of linear-reduced oligomers of hexoses (Figure 5A and B). All fragmentation spectra were dominated by a series of Y-type (*m/z* at 503, 716, 929, 1143, 1356) and B-type (*m/z* at 466, 679, 892, 1105, 1319) ions resulting from the cleavage of glycosidic bonds from terminal nonreducing and reducing ends of oligomers, respectively. In addition, two sets of ions tentatively attributed to internal <sup>1,3</sup>A or <sup>2,4</sup>A fragment ions (*m/z* at 756, 969, 1182) and to internal <sup>1,5</sup>A fragment ions (*m/z* at 651, 864, 1077, 1291) were observed as minor fragments. The nature of the <sup>1,5</sup>A fragment ions was confirmed by MS<sup>3</sup> analysis. As expected, MS<sup>3</sup>

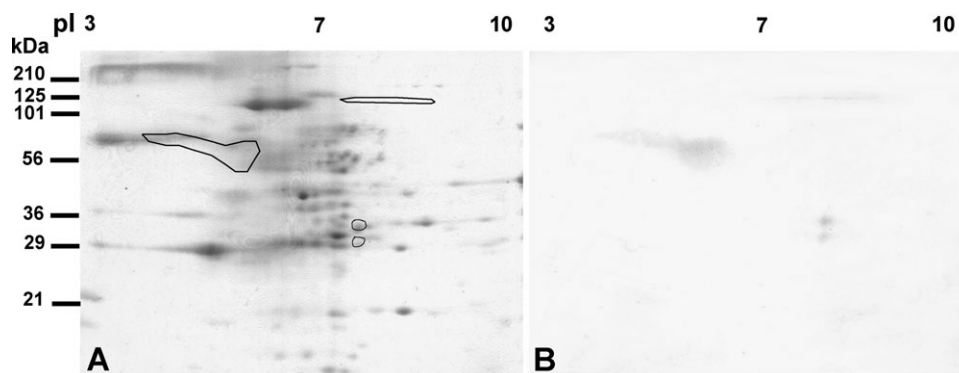


**Fig. 2.** EM localization of ConA- and GNA-binding sites in cryosectioned *E. cuculici* cells. [(A) and (B)]. ConA binding. (A) Gold particles are located on polar tube (PT) coils, as seen in an immature spore. A membranous body likely involved in the formation of the posterior vacuole is unlabeled (\*). (B) Anterior spore region showing labeled polar cap (PC). [(C) and (D)] GNA binding. (C) GNA also binds to PC. (D) Labeling of some vesicular elements in a sporoblast stage (Sb). These elements are located between densely packed Golgi vesicles (Go) and a tubular network (TN) representative of PT precursors. CW, cell wall; Nu, nucleus; Po, polaroplast. Bar, 200 nm.

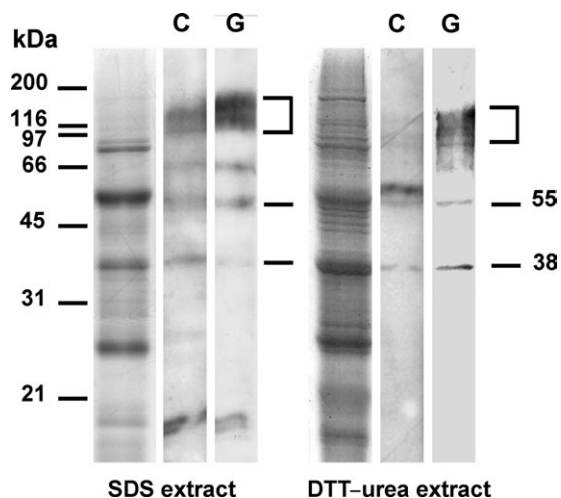
fragmentation spectra were all characterized by the presence of a set of B-type  $[M-185-(213)_n + Na]^+$  ions indicating the release of  $CH_2OCD_3-CH_2-(CHOCD_3)_2-CH_2O$  fragment and a set of Y-type ions resulting from the release of nonreducing hexose residues (data not shown). It is noteworthy that no hydroxyl group containing secondary fragment ion, indicative of the presence of branched structures, was observed in any of the CID-MS/MS spectra. Taken together, these data strongly suggested the presence of a family of mannosylated

linear oligosaccharides with a degree of polymerization (DP) ranging from two to at least eight.

*O*-mannosyl glycans consist of  $\alpha$ -1,2 linked mannose residues. In order to identify the linkage position of Man residues within the detected oligomers, permethylated *O*-glycan fractions from *E. cuculici* were submitted to methanolysis and acetylation prior to analysis by GC-MS. Total ion chromatogram (TIC) showed three major peaks labeled 1



**Fig. 3.** Two-dimensional gel electrophoresis of *E. cuculici* spore proteins. (A) Coomassie blue-stained gel. (B) Corresponding blot stained with a PAS-derived procedure. On the left, a reactive acidic region includes at least PTP1 and SWP1, two known glycoproteins assigned to the polar tube and exospore, respectively. Other reactive spots (30, 35, and 110 kDa) represent still unidentified proteins.



**Fig. 4.** ConA and GNA lectin overlay. SDS-PAGE and lectin blotting (C, ConA; G, GNA) of *E. cuniculi* proteins extracted with either usual SDS-containing lysis buffer or DTT-urea solution. First lanes show Coomassie blue-stained profiles. Common lectin-binding bands are marked.

to 3 (Figure 6A). By comparison of their retention times with standard molecules, peaks 1 and 2 were identified as 2,3,4,6-Me<sub>4</sub> Man(Me) (terminal nonreducing mannose) and 3,4,6-Me<sub>3</sub>-2-Ac Man(Me) (internal 2-linked mannose), respectively. The positions of methyl groups were confirmed by electronic impact (EI)-MS (Figure 6B and C). Similarly, peak 3 was first identified as 1,3,4,5,6-Me<sub>5</sub>-2-Ac Hex-ol residue according to its fragmentation pattern (Figure 6D). Subsequent comparison of its retention time with standards produced from acetolysis and reduction of commercial *Saccharomyces cerevisiae* mannan definitely typified it as a 2-linked Man-ol residue. This residue results from the reduction of the reducing mannose following release of *O*-glycans by reductive  $\beta$ -elimination. In accordance with the ES-MS/MS analysis, no di-substituted mannose residue indicative of branched structures was observed in GC-MS analysis. Differential integration of peak areas established that t-Man, 2-Man, and 2-Man-ol were present in a ratio of 0.8/2.9/1, establishing an average DP of five for the high molecular mass fraction. Similar results were obtained from low molecular mass *O*-glycan fraction, which differs from high molecular mass fraction only by a lower average DP of 2.5 (data not shown). It is, therefore, clear that these *O*-mannosyl glycans are made of linear stretches of 2-linked Man residues.

Anomery of mannose residues was determined by 800 MHz <sup>1</sup>H NMR analyses. One-dimensional (1-D) <sup>1</sup>H (Figure 7A) and 2-D COSY 90 (Figure 7B) NMR spectra revealed two individual anomeric protons at  $\delta$  5.224 and 5.045 ppm that correlated with their respective H-2 protons at  $\delta$  3.98 and 4.07 ppm. It also revealed a group of at least four H-1 protons (5.286–5.312 ppm), correlating with H-2 protons between 4.08 and 4.10 ppm. Chemical shifts of anomeric protons superior to 5.04 ppm as well as  $J_{1,2}$  coupling constant of approximately 1.8 Hz clearly established that all residues were  $\alpha$  anomers (Cohen and Ballou 1980; Faille et al. 1992). According to published <sup>1</sup>H NMR parameters, signals at  $\delta$  5.045 and 5.286–5.312 ppm were attributed to terminal

nonreducing  $\alpha$ -Man residue and internal  $\alpha$ 1,2-linked Man residues, whereas signal at  $\delta$  5.224 was attributed to the single  $\alpha$ -Man residue substituting Man-ol in C-2 position (Hayette et al. 1992; Trimble et al. 2004). The multiplicity of signals associated with internal ( $\alpha$ 1-2)Man residues results from the polydispersity of the oligomannosides, as revealed by MS analysis, that influences individual NMR parameters (Kobayashi et al. 1994).

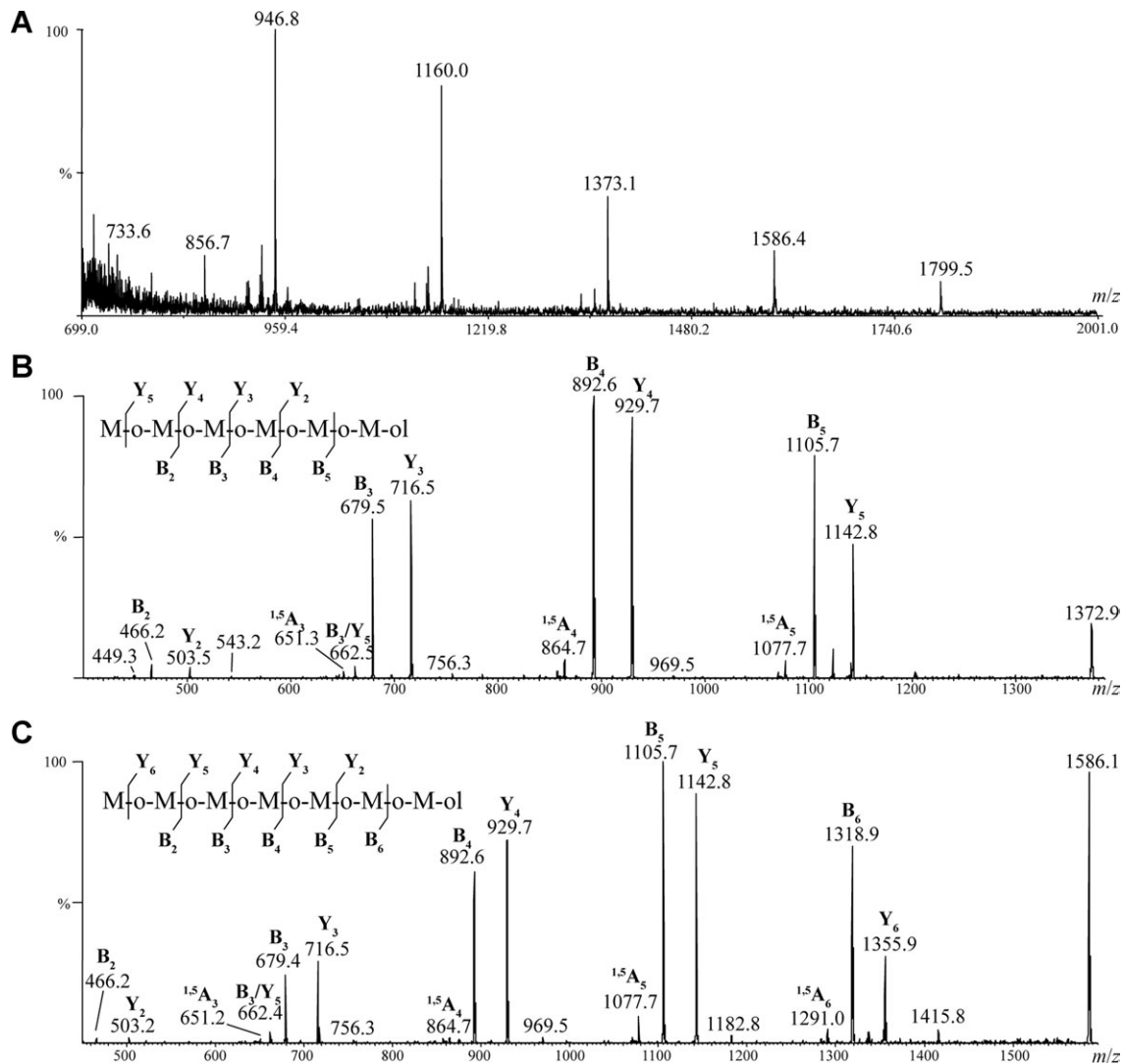
Altogether, the data collected from composition, linkage, MS, MS/MS, and NMR analyses established the presence in *E. cuniculi* of a family of *O*-linked glycans exclusively composed of  $\alpha$ 1,2-linked mannose residues, with a size ranging from two to at least eight residues. Identical strategy conducted in *A. locustae* showed very similar results. As the two species belong to two different genera that have been shown to be distantly related in rRNA phylogenetic analyses (Slamovits et al. 2004), such glycan structures might be a general feature in the microsporidian phylum.

## Discussion

As first observed in *Stempellia* spores (Vavra 1972), the application of the PATAg procedure to ultrathin sections of *E. cuniculi* and *A. locustae* spores indicated glycoconjugate richness of the polar cap. This organelle was also labeled with biotinylated ConA and GNA, which supports the presence of mannose-containing glycoconjugates. After extrusion, the polar tube must be firmly attached to the spore apex in order to maintain the integrity of the sporoplasm flowing toward a host cell. A critical role of the polar cap in this attachment is conceivable because of its positioning between apical plasma membrane and polar tube domains and its conversion into a collar-like structure during polar tube extrusion (Lom 1972). Some PATAg-positive material seen at the junction between extruded polar tube and spore body (Figure 1B) likely reflects controlled exocytosis of polar cap contents. An abundance of hydrophilic sugars associated with polar cap proteins may facilitate polar tube exit than sliding through the apical aperture. The IgG response of immunocompetent humans against *Encephalitozoon* spp. was found to be directed against carbohydrate moieties of PTP1 and of some proteins migrated as a smear in SDS-PAGE between 100 and 250 kDa (Peek et al. 2005). Immunofluorescence data supported a localization of the last antigenic glycoproteins in the anchoring region, and a role in the adherence of the spore to the host cell surface has been hypothesized by the authors. The adherence of *E. intestinalis* spores to host cells in vitro involved sulfated glycosaminoglycans of the host cell surface, and inhibition of spore adherence by chondroitin sulfate A caused a significant decrease in the percentage of infected host cells (Hayman et al. 2005). Exospore glycoproteins are the best candidates for interacting with host glycosaminoglycans. A putative contribution of polar cap glycoproteins to host cell-microsporidia interactions should occur only after polar tube extrusion.

The mannose-binding lectins ConA and GNA recognized several bands in SDS-PAGE patterns of *E. cuniculi* spore proteins, and only mannose was clearly identified after GC-MS analysis of *E. cuniculi* and *A. locustae* oligosaccharide fractions subjected to methanolysis. ConA binding was reported for protein bands within a size range of 45–57 kDa



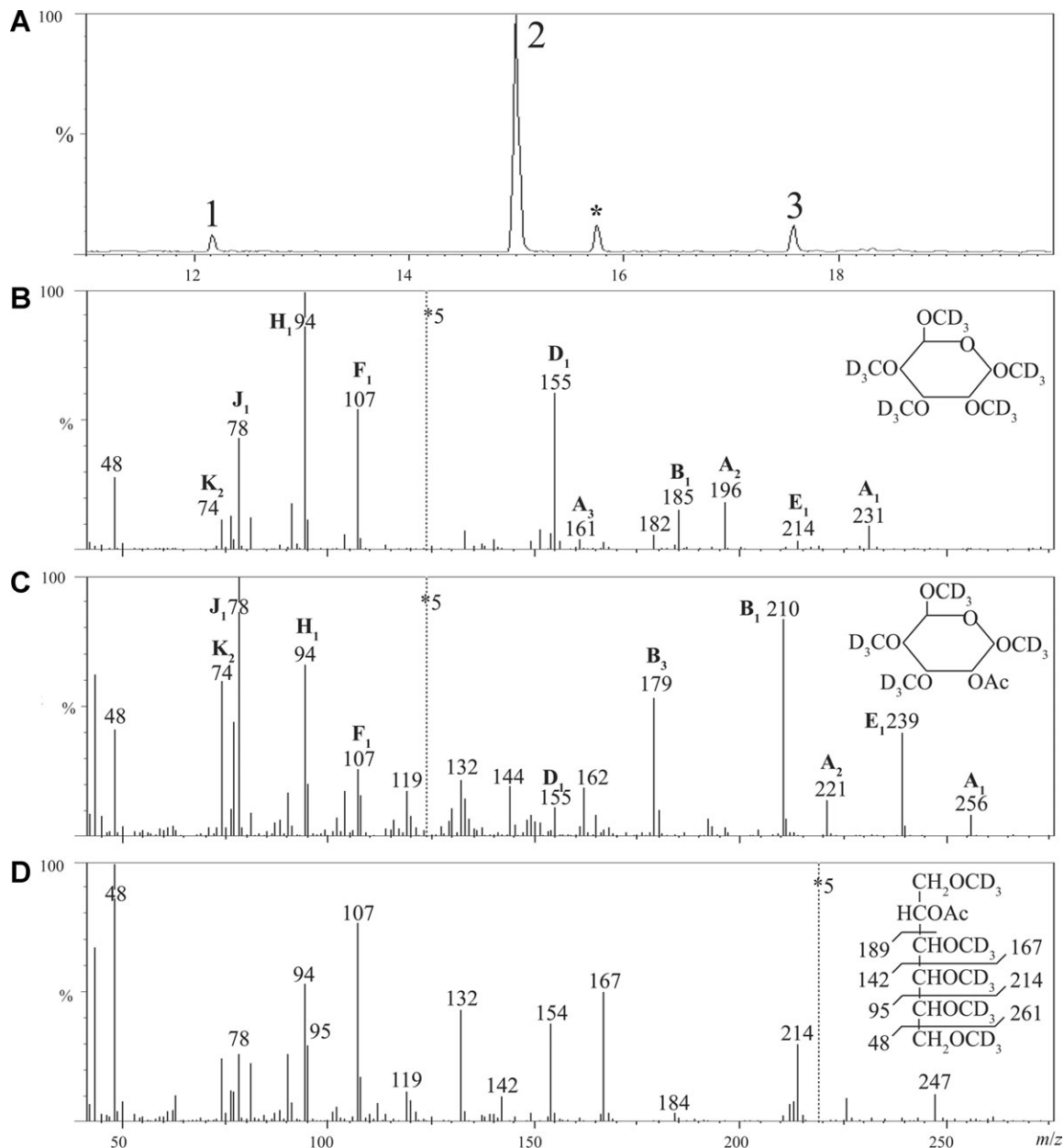


**Fig. 5.** MS analysis of glycans released by reductive  $\beta$ -elimination. (A) MALDI-MS screening of perdeuteromethylated O-glycans from *E. cucinuli*; CID-MS/MS sequencing of (B) reduced hexasaccharide at  $m/z$  1373 and (C) of reduced heptasaccharide at  $m/z$  1586, labeled according to Domon and Costello (1988). M stands for mannose residue.

in a fish-infecting microsporidian, the most labeled band being at 55 kDa (Kim et al. 1999), as for exospore proteins SWP1 and SWP2 in *E. intestinalis* (Hayman et al. 2001) and PTP1 in *E. hellem* (Xu et al. 2004), *A. locustae*, and *Paranosema grylli* (Polonais et al. 2005). SWP1 and PTP1 anomalously migrate in SDS-PAGE between 50 and 55 kDa and exist in different species, whereas SWP2 has a larger size (150 kDa) and is apparently restricted to *E. intestinalis*. In *E. cucinuli*, the ConA- and GNA-binding bands at 55 kDa may be partially correlated with a large PAS-reactive area that was also close to 55 kDa in 2-D gels and known to include both SWP1 and PTP1. Evidence for binding of PTP1 to GNA was previously obtained by lectin blotting in two insect-infecting microsporidia (Polonais et al. 2005). Whether at least one high molecular weight smeared band may contain a polar cap protein should deserve further investigations. The reactivity with GNA, a lectin that preferentially recognizes terminal  $\alpha$ 1,3-linked Man residues (Shibuya et al. 1988), may be somewhat surprising because only  $\alpha$ 1,2-linked Man

residues were detected here and no microsporidian gene encoding  $\alpha$ 1,3-mannosyltransferase was identified. However, in the work of Shibuya et al. (1988), manno-oligosaccharides with an  $\alpha$ 1,2-linked linkage were found to also inhibit mannan-GNA precipitation, although less efficiently than oligosaccharides with terminal Man( $\alpha$ 1,3)Man unit. Moreover, the retardation of glycopeptides on GNA column was strongly dependent on the number and heterogeneity of disaccharide units. The binding of GNA to homogeneous  $\alpha$ 1,2-linked mannose chains seems therefore likely.

Neither GlcNAc and Man residues nor mass-specific N-glycan signal was identified in PNGase-treated glycan fractions of the studied microsporidia. Although this cannot formally exclude the possibility of a very low frequency of N-glycosylation, it should be stressed that a real loss of N-glycosylation is consistent with bioinformatic analyses of gene repertoires in *E. cucinuli* (Katinka et al. 2001) and *A. locustae* (*Antonosporea locustae* Genome Project; <http://gmod.mbl.edu/perl/site/antonosporea01>). Strikingly,



**Fig. 6.** Linkage analysis of *E. cucurbiti* O-linked glycans by GC-MS. (A) TIC chromatogram of partially deuteromethylated and acetylated methyl-glycosides; (B-D), EI-MS spectra of compounds 1 (terminal mannose), 2 (2-linked internal mannose), and 3 (2-linked mannitol), respectively. Each compound was identified according to its retention time and fragmentation pattern.

no genes were found to encode subunits of the oligosaccharyltransferase complex needed for flipping of dolichol (Dol)-PP-GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>5</sub> across the endoplasmic reticulum (ER) membrane and then linking the high-mannose oligosaccharide to asparagine residues on nascent peptides. The lack of key enzymes for protein N-glycosylation in *E. cucurbiti* has been also verified through a recent inventory of Alg glycosyltransferases in several eukaryotic organisms; their comparison leading the authors to postulate that various secondary losses of enzymes from a common eukaryotic ancestor may have occurred (Samuelson et al. 2005). The potential *E. cucurbiti* proteome also lacks critical factors for correct folding of N-glycosylated proteins in the ER, such as processing

glycosidases and calnexin-calreticulin chaperone system (Katinka et al. 2001). In fungal organisms, the major fraction of N-linked glycans is incorporated within cell wall phosphomannoprotein complexes, and the importance of these glycans in host-fungal interactions is especially well illustrated by their involvement in the adherence of *Candida albicans* cells to host macrophages (Cutler 2001). It is noteworthy that, unlike typical fungi, microsporidia have no permanent cell wall. Proliferating intracellular stages (meronts) are indeed delimited only by plasma membrane, with cell wall formation occurring during sporogony. The low diversity of glycoprotein spots revealed after 2-D gel electrophoresis might be related to lacking N-glycosylated proteins.

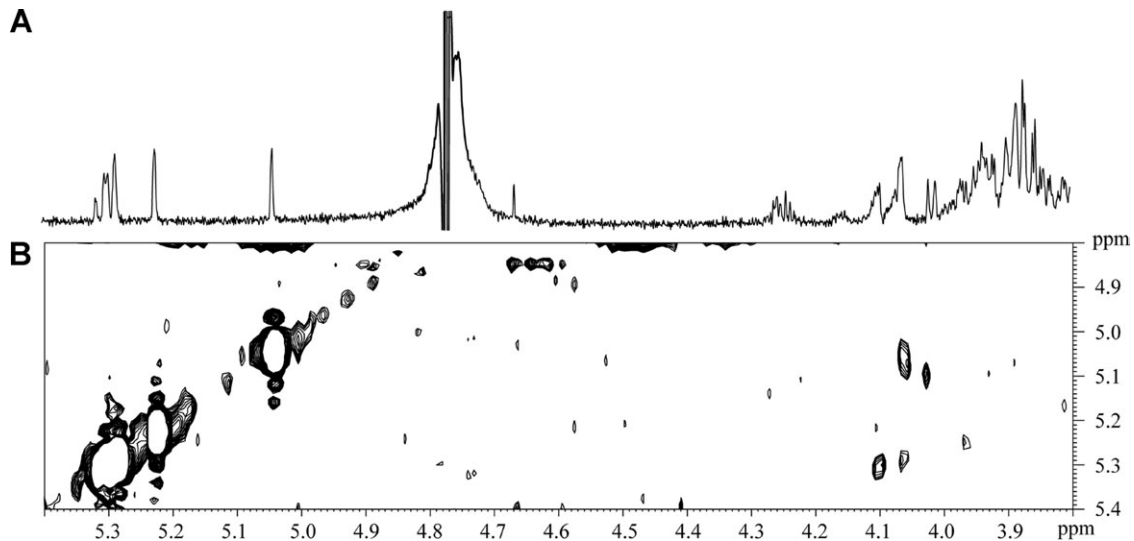


Fig. 7. 800 MHz <sup>1</sup>H NMR analysis of *E. cuciculi* O-linked glycans. (A) One-dimensional and (B) 2-D COSY-90 <sup>1</sup>H NMR spectra of glycans.

Detailed analyses of microsporidial O-glycans have revealed linear oligosaccharides consisting of  $\alpha$ 1,2-linked Man residues. These structures are comparable with those identified in several fungi and share a common  $\alpha$ 1,2-linked mannotriose with  $\alpha$ -linkage of the reducing terminal Man residue to an hydroxy amino acid (Gemmill and Trimble 1999; Willer et al. 2003). Further processing varies according to the species under consideration. In *S. cerevisiae*, the mannotriose is capped with one or two  $\alpha$ 1,3-linked Man residues, whereas in *Schizosaccharomyces pombe*, up to two galactose residues can be attached via  $\alpha$ 1,2- and  $\alpha$ 1,3-linkages. *Pichia pastoris* and *C. albicans* have oligosaccharides with only  $\alpha$ 1,2-linked Man residues. Thus, *E. cuciculi* and *A. locustae* share with the two last yeasts very similar linear O-mannosyl glycans, except that maximum glycan length is higher in microsporidia (up to eight Man residues). The immobilization of *E. intestinalis* exospore proteins SWP1 and SWP2 on ConA-agarose columns (Hayman et al. 2001) might be re-interpreted as due to the presence of O-mannosylated chains. However, why the same proteins were found to be also immobilized on WGA-agarose columns is still unclear. The *E. cuciculi* coding sequence ECU08\_1340 was initially annotated as having similarity with the 110-kDa subunit of O-GlcNAc transferase (OGT) (Katinka et al. 2001). In fact, it is improbable that ECU08\_1340 encodes such an enzyme, the partial homology concerning only tetratricopeptide repeats, not the catalytic C-terminal domain of OGT. As the microsporidian spore wall contains chitin but no  $\beta$  glucan, we tentatively suggest that binding of WGA to SWPs may be due to the presence of a GPI structure linked to chitin oligomers.

The finding of O-mannosyl glycans fits with biochemical evidence for O-mannosylation of *E. hellem* PTP1 (Xu et al. 2004) and metabolic potentials inferred from *E. cuciculi* genome sequence (Vivarès and Méténier 2004). Starting from Dol-P-Man in the ER rather than from a nucleotide sugar in the Golgi apparatus, the O-mannosylation pathway in fungal organisms (Ernst and Prill 2001) should be minimally

represented in microsporidia. Only one gene encodes  $\alpha$ 1,2-mannosyltransferase (KTR family) in *E. cuciculi* (locus ECU04\_1130; UniProtKB entry: Q8SS28\_ENCCU) and probably also in *A. locustae* (<http://gmod.mbl.edu/perl/site/antonospora01>). This excludes the presence of partially redundant enzymes involved in the addition of the second and third  $\alpha$ 1,2-linked Man residues, as demonstrated in both *S. cerevisiae* (Romero et al. 1999) and *C. albicans* (Munro et al. 2005). The conserved PMT family of protein O-mannosyltransferases is divided into PMT1, PMT2, and PMT4 subfamilies and contains up to seven members in *S. cerevisiae*. The unique member of the PTP4 subfamily forms homomeric complexes, whereas members of the PMT1 subfamily interact heterophilically with those of the PMT2 subfamily, the PMT1/PMT2 and PMT4 members differing in protein substrate specificity (Girrbach and Strahl 2003; Willer et al. 2003). In *E. cuciculi*, only two potential PMTs are present. The protein sequence ECU02\_1300 (Q825D9) is clearly representative of the PMT2 subfamily (50–52% similarity with *C. albicans* and *Aspergillus fumigatus* PMT2s). The highly divergent character of the other PMT candidate (ECU06\_0950; Q8SVA5) does not allow assignment to a known PMT subfamily. A clear homolog of ECU02\_1300 has been found in *A. locustae* (ORF 1659; <http://gmod.mbl.edu/perl/site/antonospora01>). The formation of a PMT1/PMT2-like complex in microsporidia remains debatable.

Further isolation and characterization of individual O-mannosylated proteins should be useful for a better knowledge of the molecular organization of the microsporidian invasion apparatus, including the polar cap, and of possible ligands involved in host–microsporidia cell interactions. Moreover, as microsporidian gene potentialities exist for glypiation (Vivarès and Méténier 2004) and some recently studied endospore proteins are likely GPI-anchored (Brosson et al. 2005; Peuvél-Fanget et al. 2005; Xu et al. 2006), physicochemical analyses are still needed to elucidate the precise structure of these GPI anchors.

## Materials and methods

### Isolation of microsporidian spores

*E. cucinuli* GB-M1, a mouse isolate that was used for genome sequencing (Katinka et al. 2001), was produced on MDCK cells as previously described (Delbac, Duffieux, et al. 1998). Parasite cells were released in culture media by natural lysis of heavily infected MDCK cells. Culture media were harvested and then parasite cells were sedimented and repeatedly washed with phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4, through 10 successive centrifugations (20 000g, 3 min) to remove host cell contaminants of low density. The final pellet of *E. cucinuli* cells was represented by late sporogonial stages including a majority of mature spores (more than 70%).

*A. locustae* spores, arising from infected grasshoppers, were commercially available from M&R Durango Insectary (Bayfield, CO). These spores were also washed in PBS, pH 7.4, prior to protein extraction.

### EM cytochemistry

*E. cucinuli* and *A. locustae* spores were either epoxy resin-embedded or frozen. For resin embedding, spores were fixed for 1 h in 2% glutaraldehyde, 0.05% ruthenium red, and 0.07 M cacodylate buffer, pH 7.4. After washing for 30 min in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.4, they were postfixed for 1 h in 1% OsO<sub>4</sub>, dehydrated through a graded series of ethanol, infiltrated in propylene oxide, and embedded in Epikote 812 resin (Agar Scientific, Essex, UK). Ultrathin sections were obtained with a Leica Ultracut S ultramicrotome, then classically stained with uranyl acetate and lead citrate. For ultracryotomy, spores were fixed for 1 h with 4% paraformaldehyde–0.1% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.4. After infusion for 1 h at room temperature in a 25% glycerol–5% dimethylsulfoxide mixture, the samples were rapidly frozen in slush nitrogen. Cryosections (90 nm) were obtained using a dry sectioning device at –110 °C and Ultracut S ultramicrotome fitted with the low-temperature sectioning system FC4. Sectioned material was mounted on collodion-coated nickel grids (150 meshes) and stored at 4 °C in PBS prior to cytochemical protocols.

The localization of glycoconjugates and polysaccharides was investigated using the PATAg procedure (Thiéry 1967). Unstained sections of resin-embedded or frozen cells were submitted to oxidation with 1% periodic acid for 30 min, washed in distilled water, and incubated in 0.2% thiocarbohydrazide for 4 h. After washing with 10% acetic acid and then with distilled water, grids were treated with 1% silver proteinate for 30 min.

For the localization of lectin-binding sites, cryosections were saturated for 1 h with PBS–1% ovalbumin and then incubated for 1 h with a 1:50 dilution of biotinylated ConA or GNA lectins (EY Laboratories, San Mateo, CA). Grids were subsequently reacted for 1 h with goat anti-biotin antibody (Sigma, St. Louis, MO) at 1:100, then for 1 h with 5 nm gold-conjugated antigoat IgG (Sigma) at 1:100. Cryosections were finally contrasted and protected with a 0.8% uranyl acetate–1.6% methylcellulose mixture. All specimens were examined under a JEOL 1200EX transmission EM.

### Protein extractions

For 2-D electrophoresis, *E. cucinuli* spore proteins were extracted through repeated cycles of freezing–thawing in liquid nitrogen and sonication (15 × 1 min on ice) in the

presence of 7 M urea, 2 M thiourea, 100 mM DTT, 4% CHAPS, and 0.2% SDS. For SDS–PAGE followed by lectin blotting, proteins were solubilized in either Laemmli buffer (“SDS extract”) or a solution containing 4 M urea and 100 mM DTT (“DTT–urea extract”).

For MS and NMR analyses, *E. cucinuli* or *A. locustae* spores (total cell number: 10<sup>9</sup>–10<sup>10</sup>) were disrupted in a lysis buffer containing 1% (v/v) Triton X-100 and 100 mM DTT, by repeated cycles of freezing–thawing and sonication, then incubated in the extraction solution (7 M urea, 2 M thiourea, 100 mM DTT, 1% Triton X-100) under agitation for 3 days. The entire sample was finally dialyzed (6000–8000 cutoff) for further 3 days.

### 2-D gel electrophoresis and glycoprotein detection

Isoelectrofocalization (IEF) of *E. cucinuli* protein samples (50 µg) was performed along linear immobilized pH gradient strips of 7 cm, pH 3–10 (GE Healthcare, Piscataway, NJ) in rehydration buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 2% CHAPS, 2 mM tributyl phosphine, and 0.5% ampholytes), with the IPGPhor apparatus (GE Healthcare). The program of voltage increase was 30 V for 12 h, 400 V for 30 min, 500 V for 30 min, 800 V for 30 min, 1000 V for 1 h, 4000 V for 1 h, and 8000 V for 2 h. After equilibration with 50 mM Tris–HCl (pH 8.8), 6 M urea, 30% glycerol, 2% SDS, 100 mM DTT, and then 135 mM iodoacetamide, strips were deposited on 12% polyacrylamide slab gels. After SDS–PAGE for 1 h at 25 mA, proteins were either stained with Coomassie brilliant blue or electrophoretically transferred onto polyvinylidene difluoride PVDF membranes (Millipore, Billerica, MA). Glycoprotein detection on these membranes was carried out with the BioRad Immun-Blot<sup>®</sup> kit, involving successively periodate oxidation of carbohydrate groups, biotinylation, incubation with streptavidin-alkaline phosphatase conjugate, and color development with 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate and nitro-blue tetrazolium chloride.

### Lectin overlay

SDS and DTT–urea extracts of *E. cucinuli* were analyzed by SDS–PAGE (12% polyacrylamide) and separated proteins were transferred onto PVDF membranes. Blots were saturated in Tris buffer saline (TBS) (50 mM Tris–HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl)–5% skimmed milk and washed in TBS and then in lectin reaction buffer (20 mM Tris–HCl, pH 7.4, 0.2 M NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM MnCl<sub>2</sub>, and 1 mM CaCl<sub>2</sub>). They were subsequently incubated for 1 h with one of the two following biotin-labeled lectins (EY Laboratories): ConA diluted at 1:1500 and GNA at 1:1000. After washing in TBS, the membranes were reacted with a goat anti-biotin antibody (Sigma) diluted at 1:1000 and finally with a peroxidase-conjugated antigoat IgG (Sigma) at 1:10 000. Lectin binding was visualized with a chemoluminescent system (ECL + Western blot detection kit, Amersham). Specificity was tested by preincubation of lectin conjugates with an ovalbumin blot at 4 °C overnight.

### Isolation of glycan fractions

*E. cucinuli* and *A. locustae* extracts were delipidated by chloroform–methanol (2:1). The separated pellet was reduced

with 6 M guanidine chloride, 25 mM DTT in 0.6 M Tris for 8 h at 50 °C, alkylated with 50 mM iodoacetamide overnight, and dialyzed. The product (3 mL) was then digested with 1 mg of trypsin in 50 mM ammonium bicarbonate pH 8.4 at 37 °C for 1 day and with additional 0.2 mg of chymotrypsin at 37 °C under agitation for a night. A C18 Sep-Pak (Waters, Milford, CT) was used to purify the resulting supernatant. Putative N-linked glycans were released by digestion with PNGase F and PNGase A. Oligosaccharides were separated from peptides and glycopeptides using a C18 Sep-Pak. Putative O-linked glycans were released by alkaline reductive degradation in 1 M NaBH<sub>4</sub> and 0.1 M NaOH at 37 °C for 72 h. The reaction was stopped by the addition of Dowex 50 × 8, 25–50 mesh, H<sup>+</sup> form (Bio-Rad) at 4 °C until pH reaches 6.5, and after evaporation to dryness, borate salts were removed by repeated evaporation with methanol. Total material was subjected to cationic exchange chromatography on Dowex 50 × 2, 200–400 mesh, H<sup>+</sup> form (Bio-Rad) to remove residual peptides. The oligosaccharide fraction was then purified on a Bio-Gel P2 column (Bio-Rad) and C18 Sep Pak.

#### Monosaccharide composition

Monosaccharides were analyzed by GC–MS as perheptafluorobutryl derivatives (Zanetta et al. 1999). Shortly, N- and O-oligosaccharides were subjected to methanolysis in 500 µL of 0.5 M HCl in anhydrous methanol at 80 °C for 20 h and incubated in 200 µL of anhydrous acetonitrile (ACN) and heptafluorobutyric acid (HFB) at 180 °C for 10 min. The reagents were evaporated, and the sample was dissolved in ACN prior to GC–MS analysis.

#### Permethylation and linkage analysis

Permethylation was performed according to the procedure of Ciucanu and Kerek (1984). Briefly, compounds were incubated overnight in a suspension of 200 mg/mL NaOH in dry dimethylsulfoxide (300 µL) and iodomethane (200 µL). The methylated products were extracted in chloroform and washed with water. After methanolysis, they were dried and then peracetylated in 200 µL of acetic anhydride and 50 µL of pyridine overnight at room temperature. The reagents were evaporated, and the sample was dissolved in chloroform before analysis in GC–MS.

#### MALDI-TOF and ES-MS<sup>n</sup>

The molecular masses of N- and O-oligosaccharides were measured by MALDI-TOF on a Voyager Elite reflectron mass spectrometer (PerSeptive Biosystems, Framingham, MA), equipped with a 337 nm UV laser. Native and permethylated samples were prepared by mixing directly on the target 1 µL of water (native) or ACN (permethylated) diluted oligosaccharide solution and 1 µL of 2.5-dihydroxybenzoic acid matrix solution (10 mg/mL dissolved in ACN–H<sub>2</sub>O). For electro-spray ionization multistage mass spectrometry (ES-MS<sup>n</sup>), permethylated samples were reconstituted in methanol and analyzed by mass spectrometry on a LCQ DK XP + ion trap (Thermo Finnigan, Waltham, MA) instrument. After mixing with an equal volume of methanol–0.1 M aqueous formic acid, samples were directly infused at

50 nL/min, using the nanoflow probe option for MS and MS<sup>n</sup> analyses.

#### <sup>1</sup>H NMR spectroscopy

One-dimensional and 2-D <sup>1</sup>H NMR spectra were recorded on a Bruker Avance 800 spectrometer (Université des Sciences et Technologies de Lille), equipped with a TXI probe-head. Prior to <sup>1</sup>H NMR analyses, oligosaccharides were twice exchanged with 99.97% <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O and finally solubilized in 250 µL of <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O in 5-mm Shigemi tube matched for <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O. The spectrometer operated at 300 K without solvent presaturation. The chemical shifts were expressed relative to residual acetate salts (δ 1.909 ppm). Spectral width was 8012 Hz with 16 k points for a spectral resolution of 0.49 Hz/pt. The 2-D <sup>1</sup>H–<sup>1</sup>H COSY (correlation spectroscopy) spectrum was acquired with z-gradient pulse from cosygp pulse program available in Bruker software. Spectral width was 8012 Hz for both dimensions with 4016 points for F2 and 256 points for F1 giving spectral resolution of 1.96 and 31.3 Hz/pt, respectively.

#### Acknowledgments

We thank Yves Leroy (CNRS UMR 8576) and Philippe Timmerman (CNRS UMR 8576) for technical assistance on carbohydrate composition. We are grateful to Dr Catherine Texier for her help in the interpretation of two-dimensional protein profiles.

#### Conflict of interest statement

None declared.

#### Abbreviations

ACN, acetonitrile; CID-MS/MS, collision-induced decay tandem mass spectrometry; ConA, concanavalin A; COSY, correlation spectroscopy; Dol, dolichol; DP, degree of polymerization; DTT, dithiothreitol; EI, electronic impact; EM, electron microscopy; ER, endoplasmic reticulum; ES, electro-spray; GC–MS, gas chromatography coupled to mass spectrometry; GNA, *Galanthus nivalis* agglutinin; GPI, glycosylphosphatidylinositol; HFB, heptafluorobutyric acid; IEF, isoelectrofocalization; MALDI-TOF, matrix assisted-laser desorption/ionization time of flight; MDCK, Madin–Darby canine kidney; NMR, nuclear magnetic resonance; OGT, O-GlcNAc transferase; PAS, periodic acid-Schiff; PATAg, periodic acid-thiocarbohydrazide-Ag proteinate; PBS, phosphate-buffered saline; PNGase A, peptide N-glycosidase A; PNGase F, peptide N-glycosidase F; PTP, polar tube protein; SDS–PAGE, sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis; SWP, spore wall protein; TBS, Tris buffer saline; TIC, total ion chromatogram; WGA, wheat germ agglutinin; 1-D, one-dimensional; 2-D, two-dimensional.

#### References

- Aravind L, Iyer LM, Wellems TE, Miller LH. 2003. *Plasmodium* biology: genomic gleanings. *Cell* 115:771–785.

- Bigliardi E, Selmi MG, Lupetti P, Corona S, Gatti S, Scaglia M, Sacchi L. 1996. Microsporidian spore wall: ultrastructural findings on *Encephalitozoon hellem* exospore. *J Eukaryot Microbiol.* 43:181–186.
- Bohne W, Ferguson DJ, Kohler K, Gross U. 2000. Developmental expression of a tandemly repeated, glycine- and serine-rich spore wall protein in the microsporidian pathogen *Encephalitozoon cuniculi*. *Infect Immun.* 68: 2268–2275.
- Brosson D, Kuhn L, Delbac F, Garin J, Vivares C, Texier C. Forthcoming 2006. Proteomic analysis of the eucaryotic parasite *Encephalitozoon cuniculi* (Microsporidia): a reference map for proteins expressed in late sporogonial stages. *Proteomics* 6:3625–35.
- Brosson D, Kuhn L, Prensier G, Vivarès CP, Texier C. 2005. The putative chitin deacetylase of *Encephalitozoon cuniculi*: a surface protein implicated in microsporidian spore-wall formation. *FEMS Microbiol Lett.* 247:81–90.
- Ciucanu I, Kerek F. 1984. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydr Res.* 131:209–217.
- Cohen RE, Ballou CE. 1980. Linkage and sequence analysis of mannose-rich glycoprotein core oligosaccharides by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry.* 19:4345–4358.
- Cutler JE. 2001. N-glycosylation of yeast, with emphasis on *Candida albicans*. *Med Mycol.* 39 (Suppl 1):75–86.
- Delbac F, Duffieux F, David D, Metenier G, Vivares CP. 1998. Immunocytochemical identification of spore proteins in two microsporidia, with emphasis on extrusion apparatus. *J Eukaryot Microbiol.* 45: 224–231.
- Delbac F, Peyret P, Méténier G, David D, Danchin A, Vivarès CP. 1998. On proteins of the microsporidian invasive apparatus: complete sequence of a polar tube protein of *Encephalitozoon cuniculi*. *Mol Microbiol.* 29: 825–834.
- Dell A, Reason AJ, Khoo KH, Panico M, McDowell RA, Morris HR. 1994. Mass spectrometry of carbohydrate-containing biopolymers. *Methods Enzymol.* 230:108–132.
- Domon B, Costello CE. 1988. Structure elucidation of glycosphingolipids and gangliosides using high-performance tandem mass spectrometry. *Biochemistry.* 27:1534–1543.
- Ernst JF, Prill SK. 2001. O-glycosylation. *Med Mycol.* 39 (Suppl 1):67–74.
- Faille C, Wieruszki JM, Michalski JC, Poulain D, Strecker G. 1992. Complete 1H- and 13C-resonance assignments for D-mannooligosaccharides of the beta-D-(1→2)-linked series released from the phosphopeptidomannan of *Candida albicans* VW.32 (serotype A). *Carbohydr Res.* 236:17–27.
- Gemmill TR, Trimble RB. 1999. Overview of N- and O-linked oligosaccharide structures found in various yeast species. *Biochim Biophys Acta.* 1426:227–237.
- Girrbach V, Strahl S. 2003. Members of the evolutionarily conserved PMT family of protein O-mannosyltransferases form distinct protein complexes among themselves. *J Biol Chem.* 278:12554–12562.
- Gowda DC, Gupta P, Davidson EA. 1997. Glycosylphosphatidylinositol anchors represent the major carbohydrate modification in proteins of intraerythrocytic stage *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem.* 272: 6428–6439.
- Guerardel Y, Balanzino L, Maes E, Leroy Y, Coddeville B, Oriol R, Strecker G. 2001. The nematode *Caenorhabditis elegans* synthesizes unusual O-linked glycans: identification of glucose-substituted mucin-type O-glycans and short chondroitin-like oligosaccharides. *Biochem J.* 357:167–182.
- Guha-Niyogi A, Sullivan DR, Turco SJ. 2001. Glycoconjugate structures of parasitic protozoa. *Glycobiology.* 11:45R–59R.
- Hayette MP, Strecker G, Faille C, Dive D, Camus D, Mackenzie DW, Poulain D. 1992. Presence of human antibodies reacting with *Candida albicans* O-linked oligomannosides revealed by using an enzyme-linked immunosorbent assay and neoglycolipids. *J Clin Microbiol.* 30: 411–417.
- Hayman JR, Hayes SF, Amon J, Nash TE. 2001. Developmental expression of two spore wall proteins during maturation of the microsporidian *Encephalitozoon intestinalis*. *Infect Immun.* 69:7057–7066.
- Hayman JR, Southern TR, Nash TE. 2005. Role of sulfated glycans in adherence of the microsporidian *Encephalitozoon intestinalis* to host cells in vitro. *Infect Immun.* 73:841–848.
- Katinka MD, Duprat S, Cornillot E, Metenier G, Thomarat F, Prensier G, Barbe V, Peyretailade E, Brottier P, Wincker P, et al. 2001. Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature.* 414:450–453.
- Keeling PJ. 2003. Congruent evidence from alpha-tubulin and beta-tubulin gene phylogenies for a zygomycete origin of microsporidia. *Fungal Genet Biol.* 38:298–309.
- Kim JH, Ogawa K, Wakabayashi H. 1999. Lectin-reactive components of the microsporidian *Glugea plecoglossi* and their relation to spore phagocytosis by head kidney macrophages of ayu *Plecoglossus altivelis*. *Dis Aquat Organ.* 39:59–63.
- Kobayashi H, Komido M, Watanabe M, Matsuda K, Suzuki M, Ikeda T, Oyamada H, Shibata N, Suzuki S. 1994. Structure of cell wall mannan of *Candida kefyr* IFO 0586. *Infect Immun.* 62:4425–4431.
- Kocharova NA, Knirel YA, Widmalm G, Jansson PE, Moran AP. 2000. Structure of an atypical O-antigen polysaccharide of *Helicobacter pylori* containing a novel monosaccharide 3-C-methyl-D-mannose. *Biochemistry.* 39:4755–4760.
- Lom J. 1972. On the structure of the extruded microsporidian polar filament. *Zeitung Parasitenkund.* 38:200–213.
- Méténier G, Vivarès CP. 2004. Genomics of microbial parasites: the microsporidian paradigm. In: Hirt RP, Horner DS, editors. *Organelles, genomes and eukaryote phylogeny. An evolutionary synthesis in the age of genomics.* Boca Raton (FL): CRC Press; p. 207–236.
- Munro CA, Bates S, Buurman ET, Hughes HB, MacCallum DM, Bertram G, Atrih A, Ferguson MA, Bain JM, Brand A, et al. 2005. Mnt1p and Mnt2p of *Candida albicans* are partially redundant alpha-1,2-mannosyltransferases that participate in O-linked mannosylation and are required for adhesion and virulence. *J Biol Chem.* 280:1051–1060.
- Peek R, Delbac F, Speijer D, Polonais V, Greve S, Wentink-Bonnema E, Ringrose J, van Gool T. 2005. Carbohydrate moieties of microsporidian polar tube proteins are targeted by immunoglobulin G in immunocompetent individuals. *Infect Immun.* 73:7906–7913.
- Peuvrel-Fanget I, Polonais V, Brosson D, Texier C, Kuhn L, Peyret P, Vivares C, Delbac F. 2006. EnP1 and EnP2, two proteins associated with the *Encephalitozoon cuniculi* endospore, the chitin-rich inner layer of the microsporidian spore wall. *Int J Parasitol.* 36:309–318.
- Polonais V, Prensier G, Méténier G, Vivarès CP, Delbac F. 2005. Microsporidian polar tube proteins: highly divergent but closely linked genes encode PTP1 and PTP2 in members of the evolutionarily distant *Antonospora* and *Encephalitozoon* groups. *Fungal Genet Biol.* 42: 791–803.
- Romero PA, Lussier M, Veronneau S, Sdicu AM, Herscovics A, Bussey H. 1999. Mnt2p and Mnt3p of *Saccharomyces cerevisiae* are members of the Mnn1p family of alpha-1,3-mannosyltransferases responsible for adding the terminal mannose residues of O-linked oligosaccharides. *Glycobiology.* 9:1045–1051.
- Samuelson J, Banerjee S, Magnelli P, Cui J, Kelleher DJ, Gilmore R, Robbins PW. 2005. The diversity of dolichol-linked precursors to Asn-linked glycans likely results from secondary loss of sets of glycosyltransferases. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102:1548–1553.
- Shibuya N, Goldstein IJ, Van Damme EJ, Peumans WJ. 1988. Binding properties of a mannose-specific lectin from the snowdrop (*Galanthus nivalis*) bulb. *J Biol Chem.* 263:728–734.
- Slamovits CH, Williams BA, Keeling PJ. 2004. Transfer of *Nosema locustae* (microsporidia) to *Antonospora locustae* n. comb. based on molecular and ultrastructural data. *J Eukaryot Microbiol.* 51:207–213.
- Thiéry JP. 1967. Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. *J Microscopie.* 6:987–1018.
- Thomarat F, Vivarès CP, Gouy M. 2004. Phylogenetic analysis of the complete genome sequence of *Encephalitozoon cuniculi* supports the fungal origin of microsporidia and reveals a high frequency of fast-evolving genes. *J Mol Evol.* 59:780–791.
- Trimble RB, Lubowski C, Hauer CR III, Stack R, McNaughton L, Gemmill TR, Kumar SA. 2004. Characterization of N- and O-linked glycosylation of recombinant human bile salt-stimulated lipase secreted by *Pichia pastoris*. *Glycobiology.* 14:265–274.
- Vavra J. 1972. Detection of polysaccharides in microsporidian spores by means of the periodic acid-thiosemicarbazide-silver proteinate test. *J Microscopie.* 14:357–360.
- Vavra J, Larson J. 1999. Structure of the microsporidia. In: Wittner M, Weiss LM, editors. *The microsporidia and microsporidiosis.* Washington (DC): ASM Press; p. 7–84.
- Vivarès CP, Méténier G. 2004. The microsporidia genome: living with minimal genes as an intracellular eukaryote. In: Lindsay DS, Weiss LM, editors. *Opportunistic infections: toxoplasma, sarcocystis, and*

- microsporidia. World class parasites. Boston (MA): Kluwer Academic Pub; p. 215–242.
- Weiss LM. 2001. Microsporidia: emerging pathogenic protists. *Acta Trop.* 78:89–102.
- Willer T, Valero MC, Tanner W, Cruces J, Strahl S. 2003. O-mannosyl glycans: from yeast to novel associations with human disease. *Curr Opin Struct Biol.* 13:621–630.
- Xu Y, Takvorian PM, Cali A, Orr G, Weiss LM. 2004. Glycosylation of the major polar tube protein of *Encephalitozoon hellem*, a microsporidian parasite that infects humans. *Infect Immun.* 72:6341–6350.
- Xu Y, Takvorian P, Cali A, Wang F, Zhang H, Orr G, Weiss LM. 2006. Identification of a new spore wall protein from *Encephalitozoon cuniculi*. *Infect Immun.* 74:239–247.
- Xu Y, Weiss LM. 2005. The microsporidian polar tube: a highly specialised invasion organelle. *Int J Parasitol.* 35:941–953.
- Zanetta JP, Timmerman P, Leroy Y. 1999. 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.* 9: 255–266.

### 3. Conclusion

Ces travaux ont démontré l'absence de N-glycosylation et la capacité de O-mannosylation de deux espèces de microsporidies phylogénétiquement distantes. Ces observations sont en accord avec les études bioinformatiques prédisant l'absence de toutes glycosyltransférases impliquées dans les étapes réticulaires de la N-glycosylation, ainsi qu'avec l'existence supposée d'une voie de O-mannosylation, indiquée par l'annotation de deux Protein Mannosyl Transférase (PMT) potentielles au sein du génome d'*E. cuniculi*.

Si chez d'autres microsporidies des composés O-mannosylés avaient été mis en évidence *via* des reconnaissances lectiniques, indirectes, pour la première fois, nous avons caractérisé les structures glycaniques portées par des protéines O-mannosylées. L'analyse des profils de glycosylation des deux microsporidies *E. cuniculi* et *A. locustae* a permis l'élucidation des structures glycaniques majeures présentes chez ces organismes, qui consistent en de courtes chaînes linéaires, renfermant un maximum de 8 résidus de Man liés en ( $\alpha$ 1,2), similaires à celles décrites chez certains champignons tels que *Candida albicans*.

Chez une autre microsporidie *Encephalitozoon hellem*, la protéine mannosylée PTP1 est clairement impliquée dans la réponse immunitaire de l'hôte. Seul le capuchon polaire présente une réaction PATAg-positif, indiquant une localisation préférentielle des mannoprotéines dans cet élément essentiel de l'appareil invasif. De la même façon, des lectines spécifiques du mannose se fixent préférentiellement au capuchon polaire. Néanmoins, une révélation par l'acide périodique de Schiff appliquée aux protéines séparées par électrophorèse bidimensionnelle indique cependant une très faible diversité des glycoprotéines. La purification et la caractérisation des protéines O-mannosylées pourraient être utiles à la compréhension de l'organisation de l'appareil invasif des microsporidies, dont fait partie le capuchon polaire.

Finalement, il serait intéressant d'explorer les capacités de biosynthèse des ancras GPI chez ces microsporidies, puisque des gènes codant des protéines impliquées dans la voie de glypiation ont été identifiés (Vivarès and Méténier, 2004), considérant que chez de nombreux parasites intracellulaires obligatoires, les ancras GPI possèdent une activité pro inflammatoire accrue (Debierre-Grockiego *et al.*, 2003).



### III - Second modèle: *Toxoplasma gondii*

*En collaboration avec le Professeur R.T. Schwarz, Institut für Virologie, AG Parasitologie, Philipps University, Marburg, Germany; Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UMR 8576 CNRS, Villeneuve d'Ascq, France.*

#### 1. Généralités

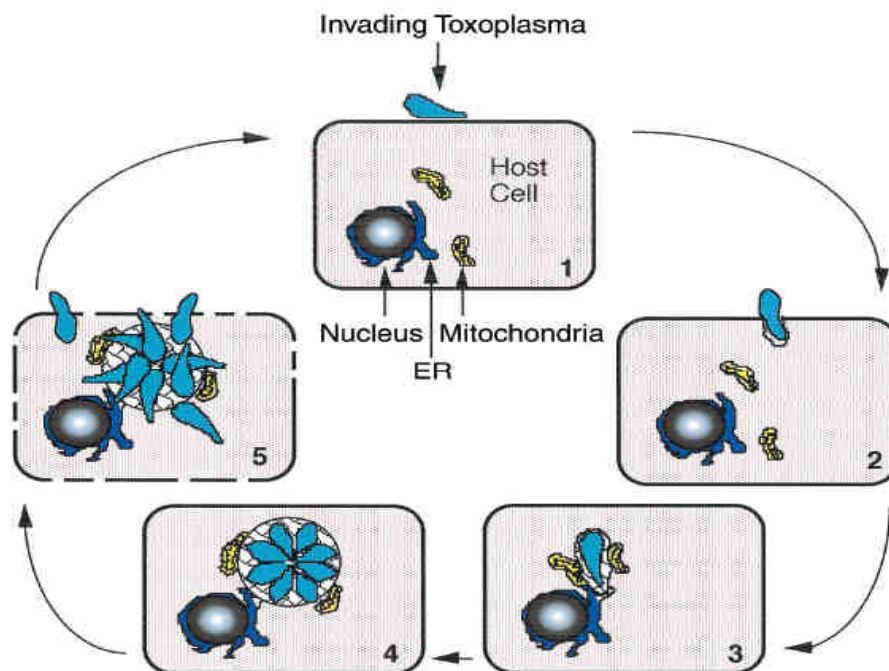
*T. gondii* est un parasite intracellulaire obligatoire appartenant au phylum des Apicomplexa, phylum rassemblant des parasites d'incidence majeure tant sur le plan humain que vétérinaire (*Plasmodium*, *Neospora*, *Eimeria*, *Cryptosporidium*, *Sarcocystis*...). Le terme Apicomplexa a été défini par l'existence chez ces parasites d'un complexe apical, ensemble d'organites spécifiques dont les fonctions sont liées à l'unique adaptabilité dont font preuve ces parasites pour migrer à travers les tissus et pénétrer activement les cellules. *T. gondii* est un excellent modèle d'étude du parasitisme intracellulaire propre aux Apicomplexa. En effet, le toxoplasme est facile à manipuler, à cultiver, il infecte *in vitro* presque tous les types cellulaires. De plus, il existe de petits modèles animaux de son infection.

#### 1.1 *T. gondii* et toxoplasmose

Ce parasite, agent étiologique de la toxoplasmose, est retrouvé dans le monde entier infectant tous types d'animaux à sang chaud (mammifères, oiseaux). Si le toxoplasme est sûrement le parasite humain le plus « cosmopolite », (la séropositivité pour la toxoplasmose chez la population adulte varie de 10 à 90 % selon les régions), l'infection est généralement asymptomatique chez les individus immunocompétents (Klaren and Kijlstra, 2002). En effet, les formes virulentes (tachyzoïtes) sont rapidement contenues par le système immunitaire, retranchant les parasites dans leur forme latente (bradyzoïtes) qui s'enkyste dans les muscles et le cerveau où ils persistent durant toute la vie de l'hôte. Cependant la toxoplasmose peut progresser en fonction du statut *immunitaire* de l'individu infecté et l'on note deux situations particulièrement graves. La primo infection toxoplasmique chez la femme enceinte peut engendrer la contamination du fœtus provoquant la mort *in utero*, avortement spontané, atteintes multiviscérales, hydrocéphalie (Jones *et al.*, 2001 ; Kravetz and Federman, 2005). De plus, la toxoplasmose est une infection opportuniste souvent responsable d'encéphalites fatales chez les malades immunodéprimés (SIDA, chimiothérapie anti-cancéreuse, greffes...) (Neuen-Jacob *et al.*, 1993).

## 1.2 Le cycle lytique du tachyzoïte

Au sein de l'hôte intermédiaire, *T. gondii*, comme la plupart des parasites du phylum des Apicomplexa, a complètement délaissé le mode de vie extracellulaire. Ainsi les tachyzoïtes, formes virulentes du parasite se multiplient dans une cellule-hôte, se disséminent après rupture de la cellule puis infectent les cellules voisines, complétant ainsi leur cycle lytique (Figure 13).



**Figure 13:** Le cycle lytique du parasite : les cinq étapes essentielles d'une infection toxoplasmique aigüe (d'après Black et Boothroyd, 2000).

### 1.2.1. Invasion

L'invasion de la cellule-hôte par *T. gondii* est un processus actif et rapide (Dubremetz 1993). Elle implique deux organites sécrétoires particulières : les rhoptries et les micronèmes (Keeley et Soldati, 2004). Le premier événement est l'attachement à la cellule-hôte qui impliquerait deux formes de contact : le premier est une interaction transitoire qui signale aux micronèmes la sécrétion, suivi d'une adhérence forte impliquant des protéines transmembranaires sécrétées par le parasite (MIC2, SAG1).

### ***1.2.2. Formation de la vacuole parasitophore***

Lors du processus d'invasion, une vacuole parasitophore se forme à partir de la membrane plasmique de la cellule-hôte. Le parasite, pénétrant la cellule-hôte, s'enveloppe d'une fraction de membrane plasmique puis stoppe sa progression et ferme sa vacuole d'un pincement. Immédiatement, la membrane est complètement remaniée : les protéines membranaires de la cellule-hôte sont rapidement exclues puis les protéines des rhoptries ou plus tardivement des granules denses sont sécrétées. La modification de la vacuole invalide toutes possibilités de fusion avec le lysosome ou toute autre vacuole de la cellule-hôte, excluant ainsi tout échange de type endo/exocytose entre hôte et parasite (Mordue *et al.*, 1999).

### ***1.2.3. Association avec le RE et les mitochondries***

Rapidement, la membrane de la vacuole parasitophore s'associe physiquement avec une partie du RE ainsi qu'avec les mitochondries de la cellule-hôte. Cette étape, critique pour la survie, est remarquablement orchestrée par les organites sécrétoires du parasite, notamment par les rhoptries. Le recrutement de ces organites particuliers jouerait un rôle dans l'acquisition d'éléments essentiels à la survie du parasite ainsi qu'à sa multiplication intracellulaire (Sibley, 2003).

### ***1.2.4. Multiplication du parasite***

La phase de multiplication dure en général de 24 à 48 heures et produit de 16 à 128 parasites en fonction du type cellulaire infecté.

### ***1.2.5. Sortie de la cellule-hôte***

Le volume de la vacuole parasitophore augmente avec le nombre de division mais n'altère pas l'intégrité de la cellule. Comme l'invasion, la sortie de la cellule-hôte est un processus dirigé par le parasite, une perméabilisation de la membrane cellulaire constituerait le signal de sortie du parasite. Cette sortie est un processus totalement destructif se traduisant

par la lyse de la cellule-hôte et la libération de parasites mobiles. Alors, les parasites libres envahissent rapidement une nouvelle cellule-hôte, complétant ainsi leur cycle lytique.

### **1.3. Transactions hôte/parasite**

#### ***1.3.1 Voie de sécrétion chez T. gondii***

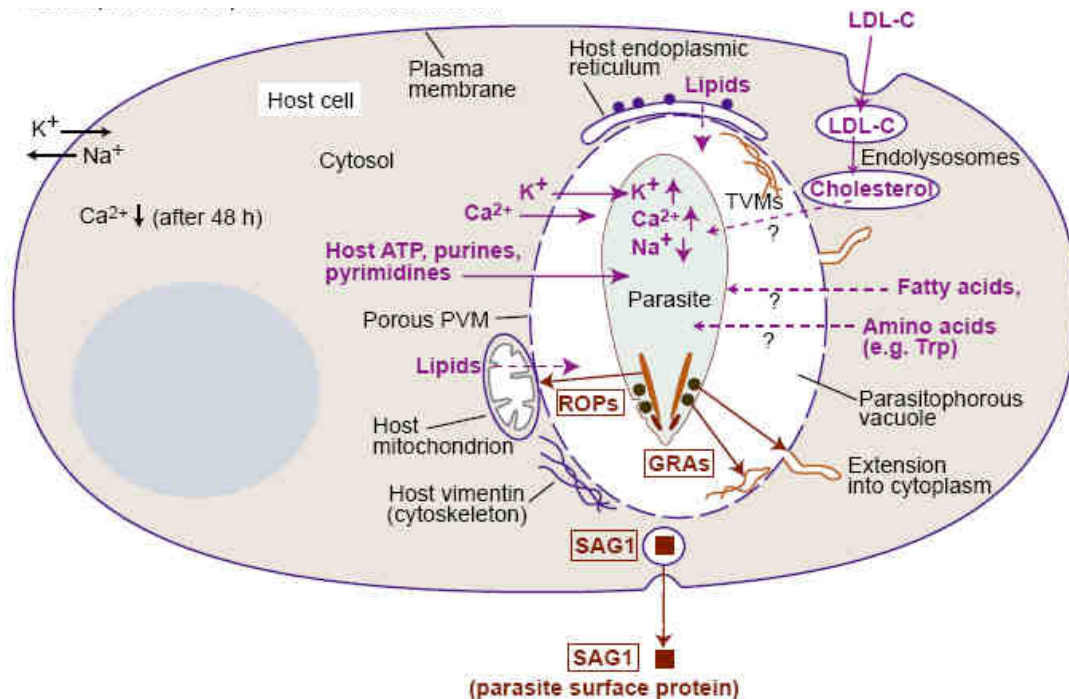
Le toxoplasme est un organisme particulièrement bien compartimenté. En effet, si ce parasite présente les organites spécifiques d'une cellule eucaryote telles que le noyau, une mitochondrie et un réticulum endoplasmique étroitement lié à la membrane nucléaire, un appareil de Golgi et de nombreux ribosomes, il possède en outre des organites particuliers, composants sécrétoires spécialisés que sont les rhoptries, les micronèmes et les granules denses. On attribue aux micronèmes l'attachement à la cellule-hôte, aux rhoptries la formation de la vacuole parasitophore et aux granules denses la réplication intracellulaire et le transport d'éléments provenant de la cellule-hôte. L'efficacité du toxoplasme lors du processus d'invasion résulte d'un chronométrage parfait au fil duquel les organites sécrétoires déploient tour à tour leurs protéines, permettant la mobilité, l'intrusion dans la cellule-hôte, la perméabilisation de la membrane de la vacuole parasitophore et le recrutement des organites de l'hôte (Carruthers, 1999).

#### ***1.3.2 Importation de matériel de la cellule-hôte***

Compte tenu de l'auxotrophie établie du parasite pour le tryptophane et les bases puriques (Schwartzman JD, Pfefferkorn ER, 1982), la perméabilité de la membrane de la vacuole parasitophore est indispensable au parasite. De plus, l'existence d'un trafic intracellulaire visant l'importation d'éléments de la cellule-hôte, notamment des lipides neutres tels que le cholestérol a été établie (Coppens, 2006). D'ailleurs, au cours de sa formation, la membrane de la vacuole parasitophore est rapidement associée au RE de la cellule-hôte ainsi qu'à la mitochondrie, siège de la biosynthèse des lipides. Cette étape est cruciale pour la survie du parasite. Les différentes transactions existant entre hôte et parasite sont schématisées par la Figure 14.

Les composants lipidiques sont non seulement importés mais aussi métabolisés pour servir le parasite. En effet, même si les modalités d'échange ne sont pas définies, les lipides de la cellule-hôte contribuent à la formation de la membrane de la vacuole parasitophore (Coppens, 2006). La multiplication du toxoplasme au sein de l'hôte implique une telle

consommation de lipides que la production *de novo* par le parasite est insuffisante. La survie et la croissance du parasite intracellulaire nécessitent l'existence d'un système de transaction contrôlé avec la cellule-hôte (Charron et Sibley, 2002).



**Figure 14:** Interactions existant entre *T. gondii* et sa cellule-hôte, d'après Coppens et Joyner, 2001.

#### 1.4 *T. gondii* et glycosylation

Quelques travaux ont traité de la N-glycosylation chez les Apicomplexa : les organismes les plus étudiés sont *Neospora caninum*, *Cryptosporidium parvum* ainsi que *Plasmodia*. L'existence d'une telle modification post-traductionnelle chez ces parasites restent très controversée (Guha-Niyogi *et al.*, 2001). Le manque d'informations structurales disponibles actuellement quant à la présence d'une N-glycosylation chez les Apicomplexa est lié à la difficulté d'isoler des échantillons exempts de contamination cellulaire lorsque l'on étudie des parasites intracellulaires stricts.

Chez *Toxoplasma gondii* (Guha-Niyogi *et al.*, 2001) les structures des ancrages GPI (Glycosyl Phosphatidyl Inositol), molécules fortement représentées à la surface du parasite, ont été établies (Boothroyd *et al.*, 1997). De plus, des O-glycannes mono- et disaccharidiques contenant des résidus de GalNAc ont été décrits sur un antigène de surface sécrété par les granules denses (Zinecker *et al.*, 1998). Plusieurs enzymes de la famille UDP-GalNAc

polypeptide transférase, responsable de l'initiation de la O-glycosylation de type mucine ont été caractérisées (Stwora-Wojczyk *et al.*, 2004).

En revanche, jusqu'à présent, les preuves de la présence de N-glycoprotéines chez ce parasite ne sont pas claires. La méthode classiquement utilisée pour identifier d'éventuelles N-glycoprotéines de surface consistait à vérifier la fixation de tachyzoïtes à un mélange de lectines. Les premières expériences ne vérifiaient pas cette fixation (Handman *et al.*, 1980), en revanche une série de publications apportent des informations contraires, relevant la fixation de tachyzoïtes ou même de glycoprotéines isolées à la concanavaline A (Mauras *et al.*, 1980; Johnson *et al.*, 1981; Sharma *et al.*, 1983). La première preuve de N-glycosylation chez le toxoplasme a été apportée par la découverte de quatre structures N-liées sur la protéine de surface gp23, ne possédant ni acide sialique ni fucose, mais de la GalNAc en position terminale (Odenthal-Schnittler *et al.*, 1993). De plus, des microsomes de *T. gondii* semblent produire de précurseurs oligosaccharidiques  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  et  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  liés au dolichol (Dieckmann-Schuppert *et al.*, 1994). De plus, des mutants STT3 de levure sont complétés par une surexpression du gène STT3 de *T. gondii* (Shams-Eldin *et al.*, 2005). Cependant, l'un des cinq antigènes de surface majeurs des tachyzoïtes, SAG1, contient un site de N-glycosylation potentiel (Odenthal-Schnittler *et al.*, 1993), qui reste cependant inoccupé chez le parasite alors que l'expression hétérologue en cellules CHO conduit à l'occupation du site (Kim *et al.*, 1994).

Le séquençage et l'annotation du génome de *T. gondii* ont mis en évidence la présence de certaines des glycosyltransférases de type ALG, enzymes impliquées dans la biosynthèse du précurseur oligosaccharidique indispensable à la biosynthèse des N-glycannes. Tout comme pour STT3, ces gènes ALG présentent une homologie importante avec les enzymes ALG de la levure ou de l'homme, suggérant des activités identiques au sein du parasite. L'absence de certaines glycosyltransférases suggère cependant un métabolisme tronqué de la biosynthèse des N-glycannes chez *T. gondii*.

## **2. Résultats**

### ***2.1 Présentation des résultats***

L'ensemble des travaux effectués sur le potentiel de N-glycosylation de *Toxoplasma gondii* sont résumés sous la forme d'un manuscrit intitulé : *Dual origin of Toxoplasma gondii N-glycosylation*.

## Dual origin of *Toxoplasma gondii* N-Glycans

Garenaux, E.<sup>1</sup>; Shams-Eldin, H.<sup>2</sup>; Chirat, F.<sup>1</sup>; Michalski, J.C.<sup>1</sup>; Cacan, R.<sup>1</sup>; Guérardel, Y.<sup>1</sup>; Schwarz, R.T.<sup>1,2</sup>

[1] Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UMR 8576 CNRS, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655, Villeneuve d'Ascq cedex, France

[2] Institut für Virologie, AG Parasitologie, Philipps University, Marburg, Germany.

## Introduction

N-linked glycosylation, as the most frequent modification of secreted proteins in eukaryotic cells, plays an crucial role in both protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum (Hammond and Helenius, 1995) but also in proteins trafficking through the secretory pathway (Fiedler and Simons, 1995). In eukaryotes, asparagine-linked glycosylation (ALG) is initiated in the ER-membrane by the synthesis of lipid-linked oligosaccharides in the dolichol-pathway (Fig.1A) (Wirth *et al.*, 1979; Schwarz and Datema, 1982; Kornfeld and Kornfeld, 1985; Lehle *et al.*, 1995; Helenius and Aebi, 2004). It implies that prior to transfer on any protein, a precursor tetradecasaccharide is assembled on a lipid carrier, the dolichol, *via* a pyrophosphate linkage to generate a Dol-PP-oligosaccharide (DolPPOS). This precursor oligosaccharide  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$  is known to be assembled in a stepwise manner by means of specific glycosyltransferases (Alg1–Alg12). The five first mannose residues are transferred stepwise from GDP-Man to the chitobiose core, leading to the original structure  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ . After flipping on the luminal side of ER, four more mannose residues are added by luminal mannosyltransferases form Dol-P-Man. The last three glucose residues are added from Dol-P-Glc, completing the N-glycan precursor ( $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ ) that is finally transferred onto nascent protein on the consensus motif Asn-X-Ser/Thr (Fig. 1A). This central reaction is catalyzed by the hetero-oligomeric protein complex oligosaccharyltransferase (OST), a complex containing a catalytic subunit, STT3 (Zufferey *et al.*, 1995; Parodi, 2000).

Whereas many reports are available concerning N-glycosylation in free-living organisms, information regarding obligate intracellular parasites is still fragmentary. Compiled data concerning ALG genes in several eukaryotic organisms suggest that database mining allows prediction of DolPPOS structures synthesized by any organism (Samuelson *et al.*, 2005). Such prediction has been verified in several unicellular organisms such as *Trypanosoma cruzii*, *Tetrahymena thermophilia* or *Leishmania major*, thanks to previously existing structural data ((Parodi, 1993 ; Yagodnik, 1987) or to additional experiments (*Trichomonas vaginalis*, *Entamoeba histolytica*). It is noteworthy that the capacity of classical O-linked and N-linked glycosylations may be highly reduced in some species exhibiting an obligate intracellular lifestyle. This is the case of the apicomplexan parasites *Plasmodium falciparum* that presents a low level of N-glycosylation (Gowda *et al.*, 1997) and of two microsporidian species which seem to have lost the ability to synthesize N-linked glycans through various secondary losses of key enzymes of N-glycosylation pathway ((Katinka *et al.*,



2001; Taupin *et al.*, 2007). Similarly to *P. falciparum*, glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchors appear as major carbohydrate modification of *Toxoplasma gondii* proteins (Striepen *et al.*, 1992; Zinecker *et al.*, 1997; Gowda *et al.*, 1997). *T. gondii* is a very promiscuous parasite, infecting *in vitro* almost every kind of cell, is easy to manipulate and shares common lifestyle with the other members of its phylum. Thus, these features make of *T. gondii* an promising model for the study of biosynthesis and role of glycans in apicomplexa phylum. Furthermore, *T. gondii*, as the ethological agent of toxoplasmosis is found worldwide in a large range of warm-blooded vertebrates at a very high prevalence and presents a serious sanitary threat (Klaren and Kijlstra, 2002). Indeed, acute *Toxoplasma* infection during pregnancy in non-immune women may cause congenital transmission resulting in serious birth defects (Jones *et al.*, 2001; Kravetz and Federman, 2005). Additionally, it has emerged as an important opportunistic pathogen for immunocompromised persons as AIDS patients that often lead to fatal encephalitis (Neuen-Jacob *et al.*, 1993).

First direct biochemical evidence of *N*-glycosylation on the tachyzoite glycoprotein gp23 provided a strong impetus for future studies on *N*-glycosylation in *T. gondii* (Odenthal-Schnittler *et al.*, 1993).

However, lack of structural data constitutes a major shortcoming to the deciphering of glycoconjugates metabolism through data mining and gene identification. Although *T. gondii* was shown to express a functional STT3p (Shams-Eldin *et al.*, 2005), its genome sequence analysis pointed out to apparent lacking of ALG3, ALG9 and ALG12, corresponding to the set of luminal mannosyltransferases using Dol-P-Man as donor (Samuelson *et al.*, 2005; <http://www.toxodb.org/toxo/home.jsp>), suggesting profound modification in the biosynthesis pathways of *N*-glycans. Thus, based on the presence of a specific subset of ALG genes orthologues, *T. gondii* has a potential enzymatic equipment for synthesizing the truncated oligosaccharide precursor Glc<sub>3</sub>Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-PP-Dol, but not complete Glc<sub>3</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-PP-Dol, (Table 1 ; Fig. 1B), which leaves the nature of the transferred oligosaccharide onto nascent proteins as an open question.

We propose to perform structural analysis of *N*-glycosylation of apicomplexan parasite *T. gondii*. After identification of the genes for *N*-glycosylation synthesis present in *T. gondii* by database mining, we confirmed the mRNA sequence and expression of a crucial gene involved in the dolichol cycle, alg 7. Besides, we performed analyses of *N*-glycosylation profile of this obligate intracellular parasite in different cell types, including glycosylation mutant. Taken together, these data may lead to a better understanding of the *N*-glycosylation pathway involved in this parasite.

## Results

### *Cloning of ALG7 and complementation in yeast strain: evidence for a functional set of ALG enzymes in T. gondii*

As an initial step toward a genetic evaluation of a potential regulation of the N-glycosylation in *T. gondii*, we demonstrated that the *T. gondii* *alg 7* gene homolog does code for a functional product, the GlcNAc-1-P transferase, which initiates the biosynthesis of N-glycan precursors. Our cloning strategy was based mainly on a BLAST search approach, using sequences of homologue *alg7* genes of different species as probes to systematically search for the homologous gene in data provided by the Toxoplasma Genome resource (<http://www.toxodb.org/toxo/home.jsp>). A 338 bp partial open reading frame sequence of an identified EST clone was identified and used to screen *T. gondii* Lambda ZAP cDNA library. A positive clone with about 2 kb insert was obtained, with 1503 bp ORF, predicted to encode a 54 KDa type III transmembrane protein. The homologue was checked also for Pfam motifs and conserved residues, as well as topology and hydrophobicity comparisons, after which it was submitted to EMBL Data Bank nucleotide sequence database with the Accession No. AJ436993. The deduced protein sequence shows 36.3% and 43% identity to amino acid sequences of the *S. cerevisiae*- and *Homo sapiens*- homologue proteins, respectively. The cloned *T. gondii* ALG7 complemented a conditional lethal yeast mutant (Fig 2 A & B), which considered as good evidence for the presence of a functional set of ALGs in *T. gondii*. Thus, the presence of genes coding for two functional key enzymes that initiate DolPPOS precursor synthesis (ALG7) and transfer the final product to nascent protein (STT3) (Shams-Eldin *et al.*, 2003) strongly suggests that the parasite exhibits a functional, although truncated, N-glycosylation pathway.

The occurrence of a functional dolichol cycle was confirmed by showing that *T. gondii* and its host cell exhibited distinct DolPPOS profiles. Indeed, whereas profiles of DolPPOS oligosaccharide moieties from control VERO cells is characterized by prominent ubiquitous  $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  and  $(\text{Glc})_{1-3}\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  (Fig. 3A; Table 2), tachyzoites exhibit a simpler pattern only containing  $\text{Hex}_8\text{GlcNAc}_2$  and  $\text{Hex}_9\text{GlcNAc}_2$  (Fig. 3B). Observation of biosynthetic precursors with more than 8 hexoses being in apparent contradiction with predictions based on gene identification, we looked at the nature of N-glycans substituting proteins through a glycomic approach by releasing glycans from total pool of proteins and analysing their distribution by mass spectrometry (MS).

At first, we established glycosylation profile of *T. gondii* in two different host cells: Vero and HFF cells. Profiles of host cell and parasites are very similar regarding to oligomannosyl type structures (figure 4 and 5; table 3 and 5), but additionally, host cells exhibits minor hybrid or complex type structures. Aim of this study was not to go through complete identification of every type of N-glycans in *T. gondii* but to obtain a N-glycosylation profile. Obviously, by working so, major compounds are oligomannosyl type structures, for example we did not identified sialylated N-glycans in Vero cells, although their presence is suggested by GC analysis (Table 4). This may be the result of laser induced desialylation as previously demonstrated (Weeler and Harvey, 2000). Anyway, in those two different cell systems, *T. gondii* glycoproteins exclusively exhibit Hex<sub>(3-9)</sub>GlcNAc<sub>2</sub> N-glycans.

#### *T. gondii* in B3F7 only exhibits glucose containing biantennary N-glycans

Additionally, we cultured *T. gondii* in mutant CHO B3F7, a Dol-P-Man deficient cell line due to a lack of Dol-P-Man synthase (Stoll, 1986). Those mannosylphosphoryldolichol-deficient cells are not able to transfer Dol-P-Man during the biosynthesis of the lipid-linked N-glycan precursor (Fig 1C). Instead of synthesizing the classical Glc<sub>1-3</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub> oligosaccharides, they produce uncommon precursor Glc<sub>(0-3)</sub>Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub> and transfers preferentially Glc<sub>3</sub>Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub> onto newly synthesized proteins (Duvet *et al.*, 1998). Interestingly, we obtained two totally different profiles when considering cell and parasite (figure 6). In this cell system, parasite exhibits N-glycans from Hex<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub> to Hex<sub>8</sub>GlcNAc<sub>2</sub>, whereas B3F7 cells exhibit mainly Man<sub>(3-4)</sub>GlcNAc<sub>2</sub> as well as minor complex type N-glycans. Indeed, accordingly to literature, we observed in figure 6 that the mutant CHO cell line exhibits major biantennary Man<sub>4</sub>GlcNAc<sub>2</sub> (Duvet *et al.*, 2000). Compounds at m/z 1497, 1659 and 1721 potentially correspond to Glc<sub>1-3</sub>Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub> and not to Man<sub>5-8</sub>GlcNAc<sub>2</sub>. Furthermore, we observed a large number of complex type N-glycans (Table 6). It is noteworthy that the deficiency of the DolPMan synthase is not complete, as revealed by the presence of Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub> (m/z 1905). The presence of minor oligomannosyl type N-glycans in CHO B3F7 was confirmed after  $\alpha$ -(1,2) mannosidase treatment.

Considering that the parasite was supposedly only able to synthesize Glc<sub>3</sub>Man<sub>5</sub>, we had to explore further those results and to probe if the parasite was building Man<sub>8</sub>GlcNAc<sub>2</sub> or Glc<sub>3</sub>Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>. In the offing to probe the structural feature of N-glycans produced by *T. gondii* in CHO B3F7, we used a strategy based on the use of an ( $\alpha$ 1-2) mannosidase. The exquisite specificity of *Aspergillus saitoi* exo-mannosidase toward ( $\alpha$ 1-2) linkage permitted to

differentiate the linear ER related compounds (Fig 7A) from Golgi-degradation products (Fig 7B). Additionally, we can differentiate between classical oligomannosyl type structures and glucose-containing structures (figure 7C and D). This strategy relies on both the sugar content and the linkages. All terminal ( $\alpha$ 1,2) mannoses are susceptible to mannosidase treatment. The efficiency of digest was evaluated by MS analysis using a standard mixture of high mannose-type chains ranging in size from  $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$  to  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ . This demonstrated that  $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$  to  $\text{Man}_9\text{HexNAc}_2$  were completely degraded to branched  $\text{Man}_5\text{HexNAc}_2$  and small amount of  $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$  (Fig 8). None ( $\alpha$ 1,3) or ( $\alpha$ 1,6) mannosidase activity has been observed. Thus, when digesting oligomannosyl type structures, the major product is branched  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ .

First concern was to determinate the nature of N-glycans produced by *T. gondii* in B3F7 cells (figure 9). We observed that compounds at m/z 1173 and 1335 totally disappeared after mannosidase treatment, profiting to  $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ . This susceptibility indicates that those compounds are biantennary N-glycans (fig 9)  $\text{Man}(\alpha$ 1,2) $\text{Man}(\alpha$ 1,2) $\text{Man}(\alpha$ 1,3)[ $\text{Man}(\alpha$ 1,6)] $\text{Man}(\beta$ 1,4) $\text{GlcNAc}(\beta$ 1,4) $\text{GlcNAc}$ . Besides, compounds at m/z =1497, 1659 and 1821 were not susceptible to mannosidase treatment, indicating that they correspond to glucosylated species (Fig 7D). The possibility to have a mixture of oligomannosyl type structure  $\text{Man}_{6-8}\text{GlcNAc}_2$  and  $\text{Glc}_{1-3}\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  was rejected because of the total absence of compound at m/z 1335 corresponding to branched  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ . This result supports that in B3F7 cells, *T. gondii* does not built oligomannosyl types structures  $\text{Man}_{6-8}\text{GlcNAc}_2$  that could be later degraded in Golgi, but that he is only producing biantennary, glucose containing structures. A similar strategy confirmed that truncated N-glycans represent the major type of glycosylation of B3F7 cells (Fig. 10). It also confirmed the presence of small amounts of branched glycans, not observed in *T. gondii*, due to residual DolPMan synthase activity in B3F7, as already suggested by the observation of  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ .

*T. gondii* in Vero cells produces glucose containing biantennary N-glycans as well as oligomannosyl structures

Based on these results, we assessed the structures of N-glycans produced by *T. gondii* in Vero cells using the same mannosidase strategy. After mannosidase treatment, we observed the increase of  $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$  compound at m/z 1011 and a partial resistance of compounds at m/z 1497, 1659 and 1821 (Fig 11). In parallel, digestion also profited to the compound at m/z

1335 (Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>) with a total degradation of compound at m/z = 1983 (Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>). This experiment suggests the presence of a mixture of both Glc<sub>0-3</sub>Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub> and Man<sub>(5-9)</sub>GlcNAc<sub>2</sub>.

To complete those experiments, PNGase F released oligosaccharides from Vero cells were similarly treated with (α1,2)-mannosidase (Fig12). In this experiment enzymatic treatment leads to the nearly complete disappearance of Man<sub>6-9</sub>GlcNAc<sub>2</sub> (compounds at m/z 1497,1659, 1821 and 1983) profiting exclusively to the Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub> (compound at m/z 1335). Thus, we evidenced that in Vero cells, conversely to what was observed in *T. gondii*, N-glycans are exclusively branched oligomannosyl types.

## Discussion

### *ALG related genes in T. gondii*

First part of the study consisted in database mining to update the state of knowledge concerning ALG gene family in *T. gondii*. Indeed, despite the careful mining published by Samuelson and collaborators, the recent discovery of Alg homologues Alg13/14 required an update. Our data suggest, according to figure 1B and table 1, that *T. gondii* synthesize Glc<sub>3</sub>Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-PP-Dol.

### *Evidence for a functional dolichols pathway*

We demonstrated that the *T. gondii* *alg7* gene homolog does code for a functional product, the GlcNAc-1-P transferase, which initiates the biosynthesis of *N*-glycan precursors. *T. gondii* genome was previously shown to code for a functional STT3, the catalytic subunit of the Oligo Saccharyl Transferase (OST) which is the enzymatic complex responsible for the transfer of the lipid-linked oligosaccharide onto the nascent glycoproteins. The topology of *T. gondii* STT3p was shown to be similar to that of the yeast STT3p, and high level expression of the *T. gondii* STT3 is required to complement a conditional lethal STT3 yeast mutant (Shams-Eldin et al., 2005). That indicates that homologous genes for glycosylation in *T. gondii* can serve analogous functions in distantly related eukaryotes. Consequently, *T. gondii*, according to figure 1B, should synthesize the oligosaccharide precursor Glc<sub>3</sub>Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-PP-Dol. Taken together, these data strongly suggest the presence of a functional, although truncated, dolichols pathway in *T. gondii*. Indeed, the set of Dol-P-mannosyltransferase is totally missing in *T. gondii*, suggesting the biosynthesis of truncated Glc<sub>1-3</sub>Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>.

Such “partial pathways” have already been described in others organisms: flagellate *Volvox carteri* major precursor is Glc<sub>1</sub>Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-PP-Dol (Parodi, 1993) and parasite *Giardia intestinalis* only synthesizes GlcNAc<sub>2</sub>-PP-Dol (Samuelson *et al.*, 2005). After synthesis, transfer onto nascent glycoprotein is possible considering that OST was shown to be able to transfer truncated precursors (Kelleher and Banerjee, 2007).

Existence of a dolichols pathway has been checked by extracting specifically DolPPOS and analysing their carbohydrate components, pointing out the presence in *T. gondii* of Hex<sub>8-9</sub>GlcNAc<sub>2</sub> when grown in Vero cells, up to Hex<sub>8-12</sub>GlcNAc<sub>2</sub> when grown in HFF. Unfortunately, those compounds have a very quick turnover and once synthesized, the oligosaccharide is immediately transferred onto nascent protein. Therefore, their observation is very tricky simply because the quantities involved are very small. Performing the (α1-2) mannosidase strategy was excluded, making technically impossible the distinction between mannose and glucose. But this analysis clearly indicated the ability of the parasite to complete a functional dolichols pathway and pointed out the surprising presence of compounds Hex<sub>(8-12)</sub>GlcNAc<sub>2</sub>.

#### *N-glycan profiling in T. gondii: Evidence for a scavenging of synthesis intermediates from the host's cell*

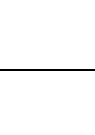
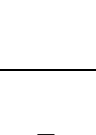
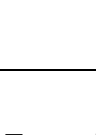

We have undergone a structural mapping of both N-glycan precursor in endoplasmic reticulum and N-glycans carried by *T. gondii* glycoproteins. Originality of this study consisted of using different host cells. This choice was motivated by risks of contamination from host cell material. Our strategy relied on highly selective extraction, effective purification and sensitive mass spectrometry analyses. Analyses in Vero and HFF host cells demonstrated the synthesis of Hex<sub>5-12</sub>GlcNAc<sub>2</sub> on both DolPPOS or glycoproteins of parasites. This was clearly in contradiction with bioinformatic data that suggested synthesis of smaller compounds Hex<sub>5-8</sub>GlcNAc<sub>2</sub>.

At that point, we three hypotheses permitted to explain the occurrence of Hex<sub>5-12</sub>GlcNAc<sub>2</sub> compounds in *T. gondii*:

- complementation by enzyme or gene scavenging
- import of biosynthesis intermediates
- contamination from host cell material.

Observations from Dolichyl-Phosphate-Mannose deficient cells (B3F7) gave crucial clues to understand N-glycans synthesis in *T. gondii*. First cells and parasites glycosylation profiles were totally different (figure 6), ruling out the possibility that parasite preparations were heavily contaminated by host cell material. The lack of complex glycans in parasite was also in agreement with a host free preparation.

So, we had to differentiate between an enzyme import and a synthesis intermediate scavenging. The choice of B3F7 cells appeared then more relevant. Characteristic of B3F7 cells and *T. gondii* regarding transfer of mannose in the lumen of RE are summarized in Table 7. B3F7 cells are Dol-P-Man deficient cell line due to a lack of Dol-P-Man synthase. If supplemented with Dol-P-Man, they may recover their Dol-P-mannosyltransferases activity, exhibiting classical oligomannosyl structures (Stoll, 1986). Thus, it is easy to confront our two hypotheses, as summarized in table 7. If parasites were able of complementation by scavenging enzymes or genes, we should have observed genuine oligomannosyl structures.

<i>Cell system</i>	<i>B3F7</i>		<i>T. gondii</i>	
<i>Luminal mannosyltransferases</i>	Functional		Apparent lack	
<i>Dol-P-Man</i>	yes (Supplementation)	no	yes	
<i>Mannose addition in ER lumen</i>	yes	no	<i>Enzyme scavenging</i> yes	<i>Intermediate scavenging</i> no
<i>Assignment</i> Hex <sub>8</sub> GlcNAc <sub>2</sub>				

**Table 7:** Characteristic of *T. gondii* and B3F7 mutants of CHO regarding intraluminal mannosylation of precursor DolPPOS.

Mannosidase treatment of N-glycans from *T. gondii* grown in B3F7 (Figure 9) confirmed the absence of genuine oligomannosyl type N-glycans.

Prior to any conclusion, a last aspect needed to be clarified. If glycoproteins from B3F7 bears major biantennary  $\text{Man}_4\text{GlcNAc}_2$  (Figure 10), those Dol-P-Man synthase deficient cells produce precursor  $\text{Glc}_{0-3}\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  and transfer preferentially  $\text{Glc}_3\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  onto newly synthesized proteins (Duvet *et al.*, 1998). Thus, parasite could have scavenged  $\text{Glc}_3\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ -PP-Dol from the host cell and transferred it onto proteins.

First argument against this hypothesis was the complementation we obtained with Alg 7, indicating that this *T. gondii* enzyme is functional, and we can suppose that other genes reported from database mining should be as well. But second and more convincing argument came from parasites cultured in Vero cells. Indeed, eager to verify that the parasite was able to synthesize N-glycans on his own, we digested N-glycans of *T. gondii* grown in Vero cells with mannosidase. At first, when we mapped N-glycans from *T. gondii* glycoproteins grown in HFF or Vero, we thought that parasite was building genuine oligomannosyl type structures, as its host's cell. But after mannosidase treatment, major compound corresponding to  $\text{Hex}_8\text{GlcNAc}_2$  clearly appeared as a mixture of  $\text{Glc}_3\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  and genuine  $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$  (Fig 11). We can suppose that similar observation would have been obtained from DolPPOS after mannosidase treatment.

To complete this study, we similarly digested N-glycans from Vero cells (Fig 12). In contrast to *T. gondii*  $\text{Hex}_{6-9}\text{GlcNAc}_2$  signals totally disappeared, profiting only to compound  $\text{Hex}_5\text{GlcNAc}_2$ . We did not observe either increase of  $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$  signal or resistance of hypothetical  $\text{Glc}_{1-3}\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ , which established the presence of oligomannosyl structures only, conversely to what was observed in *T. gondii* grown in Vero cells that contained a mixture of biantennary, glucosylated glycans and typical oligomannosyl structures.

Mannosidase digestions unambiguously established that *T. gondii de novo* synthesizes and transfers to its proteins biantennary, glucosylated N-glycans ( $\text{Glc}_3\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ ), as predicted by bioinformatics data. Surprisingly, we demonstrated that *T. gondii* glycoproteins are also substituted by classical oligomannosyl structures. Presence of genuine lipid-linked precursor in *T. gondii* grown in Vero or HFF cells demonstrates that parasite scavenges Dol-PP-OS from its host cell which are then transferred by OST onto its nascent glycoproteins, This reveals a very original aspect of *T. gondii* parasitism: the acquisition of N-glycan precursors from the host's cell and their subsequent use for N-glycosylation of functional glycoproteins. Once transferred, the destiny of scavenged and *de novo* synthesised glycans is not clear but they seem to undergo very limited processing in contrast to mammalian cells.



Indeed, compared to B3F7 mutant cells that extensively process the Glc<sub>1-3</sub>Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub> precursor glycans to Glc<sub>1-3</sub>Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub> and complex types, *T. gondii* grown in B3F7 exhibit unprocessed Glc<sub>1-3</sub>Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub> as major final product on its proteins. This is in good agreement with the apparent lack of most proteins involved in the quality control of newly synthesized proteins in *T. gondii* (Banerjee *et al.*, 2007) that preclude further processing of N-glycans in mammalian cells. In many eukaryotes, production of hybrid and complex type N-glycans is related to Golgi. We do not exclude the presence of such N-glycans in *T. gondii* but if existing, those structures would represent a very small amount of total N-glycans comparing to structures we described here.

To our knowledge scavenging of lipid-linked glycans has never been described in any organism; however, it is established that *T. gondii* scavenges several crucial elements from the host's cell. *T. gondii* is in fact auxotrophic for tryptophan and purines (Pfefferkorn *et al.*, 1982). In addition, as an actively dividing organism, *T. gondii* uses huge amounts of various lipids. Coppens and collaborators (Coppens *et al.*, 2000) proved that the parasite acquires LDL-complexed cholesterol from host cells by an undefined mechanism. Additionally, Charron and collaborators evidenced the mobilization of host's lipids by *T. gondii* that can be further metabolised by the parasite (Charron and Sibley, 2002; Coppens and Joiner, 2001). The complex life cycle of *T. gondii* parasites includes a multiplication step in an intermediate host where they totally neglect extracellular life. First interaction event is attachment of *Toxoplasma* to its host cell. This step may involve an initial transient interaction that signals micronemes secretion followed by a firm adherence that utilizes the transmembrane micronemal proteins (Carruthers, 1999). Host's cell penetration is simultaneous to the formation of a new host cell organelle, the parasitophorous vacuole that protects and camouflages the parasite. Throughout the extremely rapid course of invasion, host cell proteins are largely excluded from the Parasitophorous Vacuole Membrane (PVM) and parasite pours out rhoptries or dense granules contents, targeting its own proteins directly to that membrane. Those secreted proteins are involved in membrane's permeability but also contributes to modify PV so that it becomes a nonfusogenic vacuole that does not interact with endosomes, lysosomes or other endocytic organelles (Mordue *et al.*, 1999). On the other hand, simultaneously to those modifications, two host's organelles are selectively recruited: mitochondria and endoplasmic reticulum (De Melo *et al.*, 1992; Sinai *et al.*, 1997). This phenomenon might be crucial for parasite survival (Endo *et al.*, 1981; Sinaï and Joiner, 2001) but its function and molecular mechanism are still unclear. The necessity to scavenge

DolPPOS by the parasite may be an explanation of the close relationship observed between RE and PVM.

From an evolutionary point of view, it is noteworthy that the absence of Dol-P-Man using mannosyltransferase activities in the *N*-glycosylation pathway is counterbalanced by the synthesis of very large quantities of GPI-type glycosylation (Wichroski and Ward, 2003). Considering the postulated common genetic origin for ALG enzymes and PIG enzymes involved in the biosynthesis of phosphatidyl-inositol glycans (Oriol *et al.*, 2002), one can postulate that Dol-P-Man using mannosyltransferases could have rapidly evolved toward exclusive synthesis of GPI in *T. gondii*. Presence of such enzymes in the apicomplexa family of protozoa is in agreement with this hypothesis (Delorenzi *et al.*, 2002). The possibility for the parasite to use *N*-glycan precursors synthesized by the host would then have lifted the selective pressure to keep an intact reticular *N*-glycosylation pathway and appears as a powerful drive for specific evolution of glycosylation machinery in intracellular obligatory parasites.

Once transferred, the destiny of these glycans remains unclear, however they seem to undergo very limited processing in contrast to mammalian cells. Indeed, contradictory to B3F7 mutant cells that extensively process the Glc<sub>1-3</sub>Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub> precursor glycans toward Man<sub>4</sub>GlcNAc<sub>2</sub> and complex types, *T. gondii* grown in these cells transfer mainly unprocessed Glc<sub>1-3</sub>Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub> onto nascent proteins. This is in good agreement with the apparent lack of most proteins involved in the quality control of newly synthesized proteins in *T. gondii* (Banerjee *et al.*, 2007).

**Table 1:** Genes predicted to be involved in protein *N*-glycosylation in *T. gondii*.

Gene	Function	Statistical summary on the proteins				References
		Item	Yeast	Human	<i>T. gondii</i>	
ALG7	UDP-N-acetyl-glucosamine-1-P transferase, transfers Glc-Nac-P from UDP-GlcNac to Dol-P in the ER	Molecular weight	50.37	46.09	53.95	Eckert et al. (1998) Hartog and Bishop,1987
		Residue numbers	448	408	500	
		Charge	6	3	-6	
		Isoelectric point	8.40	7.92	5.90	
DPM1	catalyzes the formation of Dol-P-Man from Dol-P and GDP-Man/ER membrane	Molecular weight	30.36	29.63	26.93	Orlean et al. (1988); Mazhari-Tabrizi et al. (1996) ; Maeda et al. (2000) ; Colussi PA, et al. (1997)
		Residue numbers	267	260	237	
		Charge	1	10	4	
		Isoelectric point	7.97	10.40	9.76	
ALG1	$\beta$ -1,4-mannosyl-transferase; essential for viability	Molecular weight	51.93	52.52	63.40	Huffaker & Robbins, 1983; Couto et al.,1984; Albright & Robbins, 1990
		Residue numbers	449	464	574	
		Charge	9	-2	10	
		Isoelectric point	9.31	7.19	8.18	
ALG2	$\alpha$ -1,3-mannosyl- and $\alpha$ -1,6-mannosyl-Transferases that catalyze two consecutive steps	Molecular weight	58.05	47.09	56.37	Jackson et al., 1993
		Residue numbers	503	416	506	
		Charge	-7	-2	1	
		Isoelectric point	6.22	7.02	7.65	
ALGII	$\alpha$ -1,2-mannosyl transferase, catalyzes sequential addition of the two terminal alpha 1,2-mannose residues to the Man5GlcNAc2-PP-dolichol	Molecular weight	63.15	55678.66	58.92	Nasr et al., 1996
		Residue numbers	548	492	540	
		Charge	13	9	13.00	
		Isoelectric point	9.70	8.48	8.72	
ALG3	Dolichol-P-Man dependent $\alpha$ -(1-3) mannosyl-transferase	Molecular weight	52.86	50.12	<b>missing</b>	Huffaker & Robbins, 1983; Sharma et al., 1990; Verostek et al, 1993; Aebi et al.,1996; Kimura et al., 1997
		Residue numbers	458	438		
		Charge	11	19		

		Isoelectric point	9.29	10.21		
ALG9	$\alpha$ -1,2-mannosyl-transferase that catalyzes the transfer of mannose from Dol-P-Man to lipid-linked oligosaccharides	Molecular weight	63.78	70.78	<b>missing</b>	Burda <i>et al.</i> , 1996
		Residue numbers	555	618		
		Charge	9	12		
		Isoelectric point	8.74	8.84		
ALG12	$\alpha$ -1,6-mannosyl-transferase that catalyzes the addition of the alpha-1,6 mannose to dolichol-linked Man7GlcNAc2,	Molecular weight	62.67	54.65	<b>missing</b>	Grubenmann <i>et al.</i> , 2002
		Residue numbers	551	488		
		Charge	-2	17		
		Isoelectric point	7.09	10.43		
ALG6	$\alpha$ -1,3-glucosyl-transferase, mutations in human ortholog are associated with disease	Molecular weight	62.78	58.34	61.14	Reiss <i>et al.</i> , 1996
		Residue numbers	544	509	564	
		Charge	15	12	10	
		Isoelectric point	9.87	8.39	8.61	
ALG5	UDP-glucose: dolichol-phosphate glucosyltransferases	Molecular weight	38.35	36.94	<b>missing</b>	Huffaker & Robbins, 1983; te Heesen <i>et al.</i> , 1994; Lennon <i>et al.</i> , 1995
		Residue numbers	334	324		
		Charge	6	10		
		Isoelectric point	9.17	10.05		
ALG8	$\alpha$ -1,3-glucosyl-transferase, similar to Alg6p	Molecular weight	67.38	60.08	81.47	Stagljar <i>et al.</i> , 1994
		Residue numbers	577	526	737	
		Charge	24	18	15	
		Isoelectric point	10.31	9.81	8.85	
ALG10	Dolichyl-phosphoglucose-dependent $\alpha$ -1,2 glucosyl-transferase	Molecular weight	61.74	55.60	66.66	Burda and Aebi, 1998
		Residue numbers	525	473	603	
		Charge	18	20	14	
		Isoelectric point	10.19	10.04	8.82	

Stt3	subunit of the oligosaccharyl-transferase that forms a subcomplex with Ost3p and Ost4p and is directly involved in catalysis.	Molecular weight	81.52	80.52	83	Yoshida <i>et al.</i> , 1995; Zufferey <i>et al.</i> , 1995; Hong <i>et al.</i> , 1996 Shams-Eldin <i>et al.</i> , 2005
------	---	------------------	-------	-------	----	--

**Table 2:** Assignment of permethylated oligosaccharides released from DolPPOS from Vero cells and *T. gondii* grown in Vero cells (MALDI-TOF analysis).

<i>Signal</i> <i>m/z</i>	<i>Composition</i>	<i>Sample</i>	
		<i>Vero</i>	<i>T. gondii</i>
1783	Hex <sub>6</sub> GlcNac <sub>2</sub>	√	
1987	Hex <sub>7</sub> GlcNac <sub>2</sub>	√	
2191	Hex <sub>8</sub> GlcNac <sub>2</sub>	√	√
2395	Hex <sub>9</sub> GlcNac <sub>2</sub>	√	√
2599	Hex <sub>10</sub> GlcNac <sub>2</sub>	√	
2802	Hex <sub>11</sub> GlcNac <sub>2</sub>	√	
3006	Hex <sub>12</sub> GlcNac <sub>2</sub>	√	

**Table 3:** Assignment of native and 2-PA coupled PNGase F released oligosaccharides from Vero cells or *T. gondii* grown in Vero cells (MALDI-TOF analysis).

<i>Native</i> <i>(m/z)</i>	<i>2-PA</i> <i>(m/z)</i>	<i>Assignment</i> <i>Composition</i>	<i>Sample</i>	
			<i>Vero</i>	<i>T. gondii</i>
933	1011	Man <sub>3</sub> GlcNac <sub>2</sub> , Na <sup>+</sup>	√	√
1079	1157	(Fuc) Man <sub>3</sub> GlcNac <sub>2</sub> , Na <sup>+</sup>	√	
1095	1173	Hex <sub>1</sub> Man <sub>3</sub> GlcNac <sub>2</sub> , Na <sup>+</sup>	√	√
1257	1335	Hex <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> GlcNac <sub>2</sub> , Na <sup>+</sup>	√	√
1419	1497	Hex <sub>3</sub> Man <sub>3</sub> GlcNac <sub>2</sub> , Na <sup>+</sup>	√	√
1460	1538	GlcNac Man <sub>5</sub> GlcNac <sub>2</sub> , Na <sup>+</sup>	√	
1501	1579	GlcNac <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> GlcNac <sub>2</sub> , Na <sup>+</sup>	√	
1581	1659	Hex <sub>4</sub> Man <sub>3</sub> GlcNac <sub>2</sub> , Na <sup>+</sup>	√	√
1622	1700	Gal GlcNac Man <sub>5</sub> GlcNac <sub>2</sub> , Na <sup>+</sup>	√	
1663	1741	Gal <sub>2</sub> GlcNac <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> GlcNac <sub>2</sub> , Na <sup>+</sup>	√	
1743	1821	Hex <sub>5</sub> Man <sub>3</sub> GlcNac <sub>2</sub> , Na <sup>+</sup>	√	√
1809	1887	Fuc Gal <sub>2</sub> GlcNac <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> GlcNac <sub>2</sub> , Na <sup>+</sup>	√	
1905	1983	Hex <sub>6</sub> Man <sub>3</sub> GlcNac <sub>2</sub> , Na <sup>+</sup>	√	√
2012	2090	Fuc Gal <sub>2</sub> GlcNac <sub>3</sub> Man <sub>3</sub> GlcNac <sub>2</sub> , Na <sup>+</sup>	√	
2028	2106	Gal <sub>3</sub> GlcNac <sub>3</sub> Man <sub>3</sub> GlcNac <sub>2</sub> , Na <sup>+</sup>	√	
2067	2145	Hex <sub>7</sub> Man <sub>3</sub> GlcNac <sub>2</sub> , Na <sup>+</sup>	√	√
2174	2252	Fuc Gal <sub>3</sub> GlcNac <sub>3</sub> Man <sub>3</sub> GlcNac <sub>2</sub> , Na <sup>+</sup>	√	

**Table 4:** Monosaccharide composition of PNGaseF released N-glycans from *T. gondii* and Vero glycoproteins (GC analysis)

Monosaccharide	Vero	<i>T. gondii</i> in Vero
Fucose	0,06	-
Galactose	0,06	0,02
Mannose	0,24	0,43
Glucose	0,31	0,28
GlcNAc	0,31	0,27
NeuAc	0,02	-

**Table 5:** Assignment of permethylated PNGase F released oligosaccharides from HFF or *T. gondii* grown in HFF (MALDI-TOF analysis).

<i>pMeth</i> <i>m/z</i>	Assignment Composition	Sample	
		HFF	<i>T. gondii</i>
1171	Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub> , Na <sup>+</sup>	√	√
1345	Fuc Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub> , Na <sup>+</sup>	√	
1375	Hex <sub>1</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub> , Na <sup>+</sup>	√	√
1579	Hex <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub> , Na <sup>+</sup>	√	√
1620	Gal GlcNAc Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub> , Na <sup>+</sup>	√	
1783	Hex <sub>3</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub> , Na <sup>+</sup>	√	√
1865	GalGlcNAc <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub> , Na <sup>+</sup>	√	
1987	Hex <sub>4</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub> , Na <sup>+</sup>	√	√
2069	Gal <sub>2</sub> GlcNAc <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub> , Na <sup>+</sup>	√	
2191	Hex <sub>5</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub> , Na <sup>+</sup>	√	√
2243	Fuc Gal <sub>2</sub> GlcNAc <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub> , Na <sup>+</sup>	√	
2395	Hex <sub>6</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub> , Na <sup>+</sup>	√	√
2488	Fuc Gal <sub>2</sub> GlcNAc <sub>3</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub> , Na <sup>+</sup>	√	
2518	Gal <sub>3</sub> GlcNAc <sub>3</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub> , Na <sup>+</sup>	√	
2599	Hex <sub>7</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub> , Na <sup>+</sup>	√	√
2692	Fuc Gal <sub>3</sub> GlcNAc <sub>3</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub> , Na <sup>+</sup>	√	

**Table 6:** Assignment of native and 2-PA coupled PNGase F released oligosaccharides of B3F7 cells and *T. gondii* grown in B3F7 cells (MALDI-TOF analysis).

Native (m/z)	2-PA (m/z)	Composition Assignment	Sample	
			B3F7	<i>T. gondii</i>
933	1011	Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub> , Na <sup>+</sup>	√	√
1079	1157	Fuc Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub> , Na <sup>+</sup>	√	
1095	1173	Hex <sub>1</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub> , Na <sup>+</sup>	√	√
1257	1335	Hex <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub> , Na <sup>+</sup>	√	√
1282	1360	Fuc GlcNAc Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub> , Na <sup>+</sup>	√	
1339	1417	GlcNAc <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub> , Na <sup>+</sup>	√	
1419	1497	Hex <sub>3</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub> , Na <sup>+</sup>	√	√
1486	1564	Fuc GlcNAc <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub> , Na <sup>+</sup>	√	
1501	1579	Gal GlcNAc <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub> , Na <sup>+</sup>	√	
1581	1659	Hex <sub>4</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub> , Na <sup>+</sup>	√	√
1648	1726	Fuc Hex GlcNAc <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub> , Na <sup>+</sup>	√	
1664	1742	Gal <sub>2</sub> GlcNAc <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub> , Na <sup>+</sup>	√	
1689	1767	Fuc GlcNAc <sub>3</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub> , Na <sup>+</sup>	√	
1743	1821	Hex <sub>5</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub> , Na <sup>+</sup>	√	√
1809	1887	Fuc Gal <sub>2</sub> GlcNAc <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub> , Na <sup>+</sup>	√	
1905	1983	Hex <sub>6</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub> , Na <sup>+</sup>	√	
2012	2090	Fuc Gal <sub>2</sub> GlcNAc <sub>3</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub> , Na <sup>+</sup>	√	
2028	2106	Gal <sub>3</sub> GlcNAc <sub>3</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub> , Na <sup>+</sup>	√	
2174	2252	Fuc LacNAc <sub>3</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub> , Na <sup>+</sup>	√	
2394	2472	LacNAc <sub>4</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub> , Na <sup>+</sup>	√	
2541	2619	Fuc LacNAc <sub>4</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub> , Na <sup>+</sup>	√	
2906	2984	Fuc LacNAc <sub>5</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub> , Na <sup>+</sup>	√	



**Figure 1:** Inventory of ALG glycosyltransferases genes and predicted dolichol-linked *N*-glycans in (A) classical mammalian cell, (B) *T. gondii* and (C) B3F7 mutant cell line.

**Figure 2:** Functional complementation of the conditional lethal *S. cerevisiae* strain YPH499-HIS-GAL-ALG7 by the *T. gondii* ALG7. The conditional lethal mutant was transformed with plasmids carrying either the Human ALG7 (HsALG7) or the *T. gondii* ALG7 (*T. gondii*ALG7). The transformed cells were then streaked onto plates containing minimal medium lacking histidine and containing either galactose (SGR) (2) or glucose (SD) (3) and incubated at 30°C.

**Figure 3:** MALDI-TOF/MS comparison of permethylated oligosaccharides derived from *DolPPOS* of (A) Vero cells and (B) *T. gondii* grown in Vero cells.

**Figure 4:** MALDI-TOF/MS comparison of native PNGase F released oligosaccharides from (A) Vero cells and (B) *T. gondii* grown in Vero cells.

**Figure 5:** MALDI-TOF/MS comparison of permethylated PNGase F released oligosaccharides from (A) HFF cells and (B) *T. gondii* grown in HFF cells.

**Figure 6:** MALDI-TOF/MS comparison of native PNGase F released oligosaccharides from (A) B3F7 cells and (B) *T. gondii* grown in B3F7 cells.

**Figure 7:** Susceptibility to *A. saitoi* exo-mannosidase digestion of (A) biantennary RE-related Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub> (B) Golgi-degraded Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub> (C) genuine oligomannosyl type *N*-glycans (D) biantennary, glucose-containing *N*-glycan.

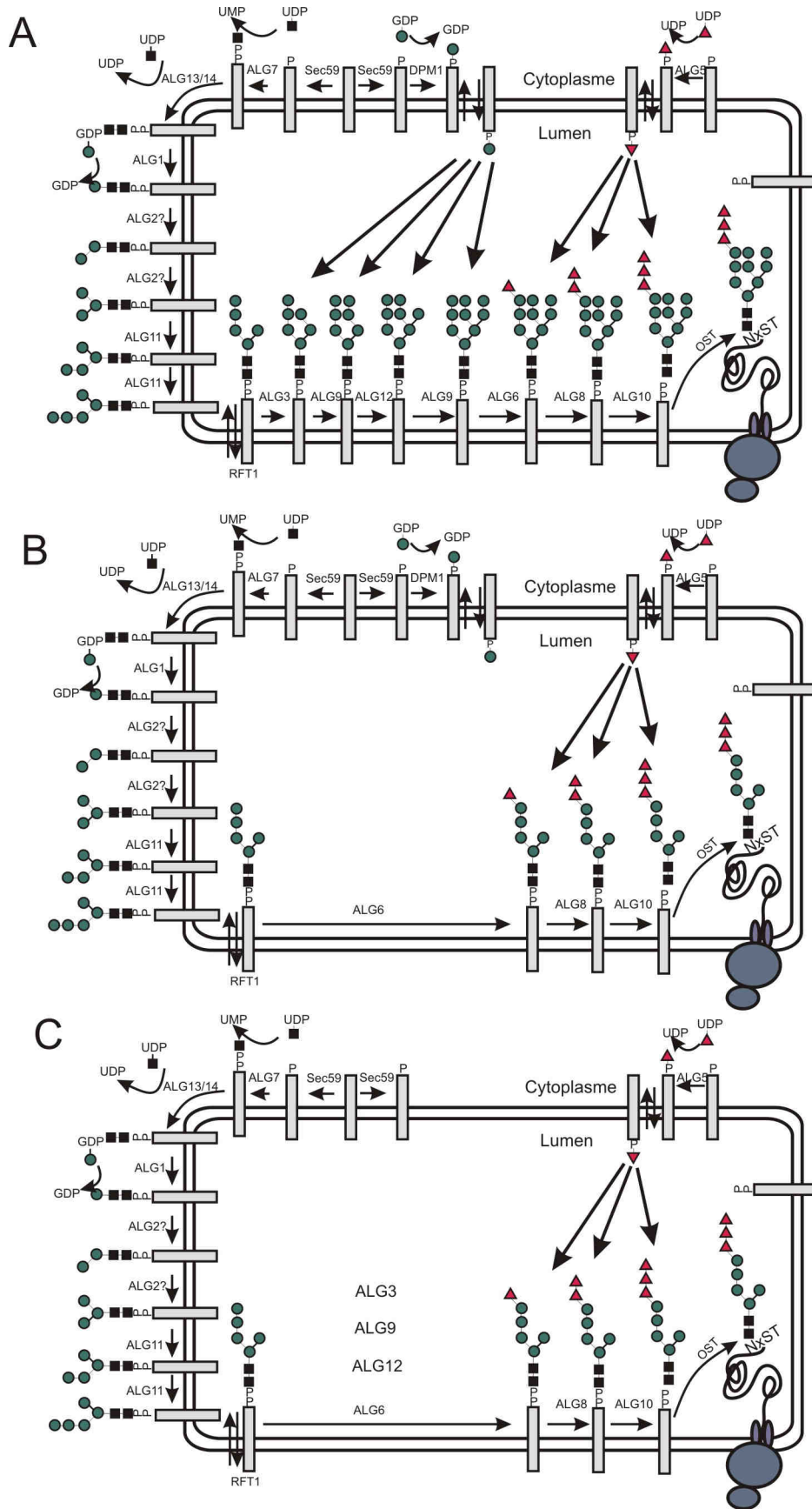
**Figure 8:** Susceptibility of standard branched oligomannosyl-types *N*-Glycans to *A. saitoi* exo-mannosidase digestion. MS profiles of 2-AP derivatized oligomannosyl-types *N*-Glycans (A) before and (B) after mannosidase digestion.

**Figure 9:** MALDI-TOF analyses of PNGase F released oligosaccharides from *T. gondii* grown in CHO B3F7 before (A) and after (B) treatment with *Aspergillus saitoi* exo-mannosidase.

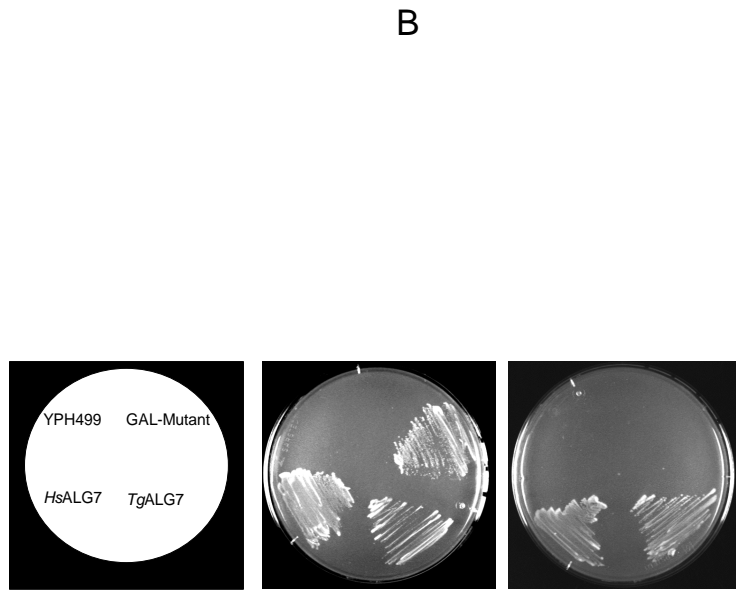
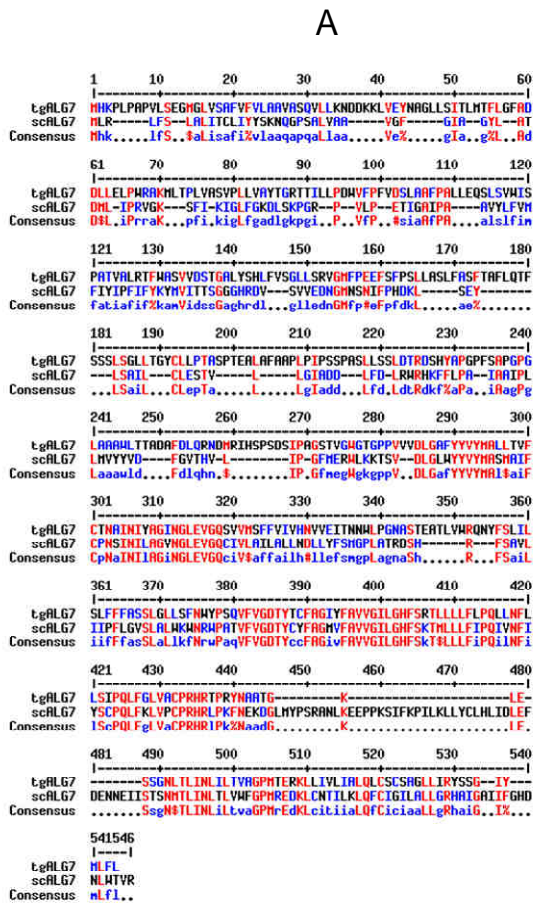
**Figure 10:** MALDI-TOF analyses of PNGase F released oligosaccharides from CHO B3F7 before (A) and after (B) treatment with *Aspergillus saitoi* exo-mannosidase.

**Figure 11:** MALDI-TOF analyses of PNGase F released oligosaccharides from *T. gondii* grown in VERO cells before (A) and after (B) treatment with *Aspergillus saitoi* exo-mannosidase.

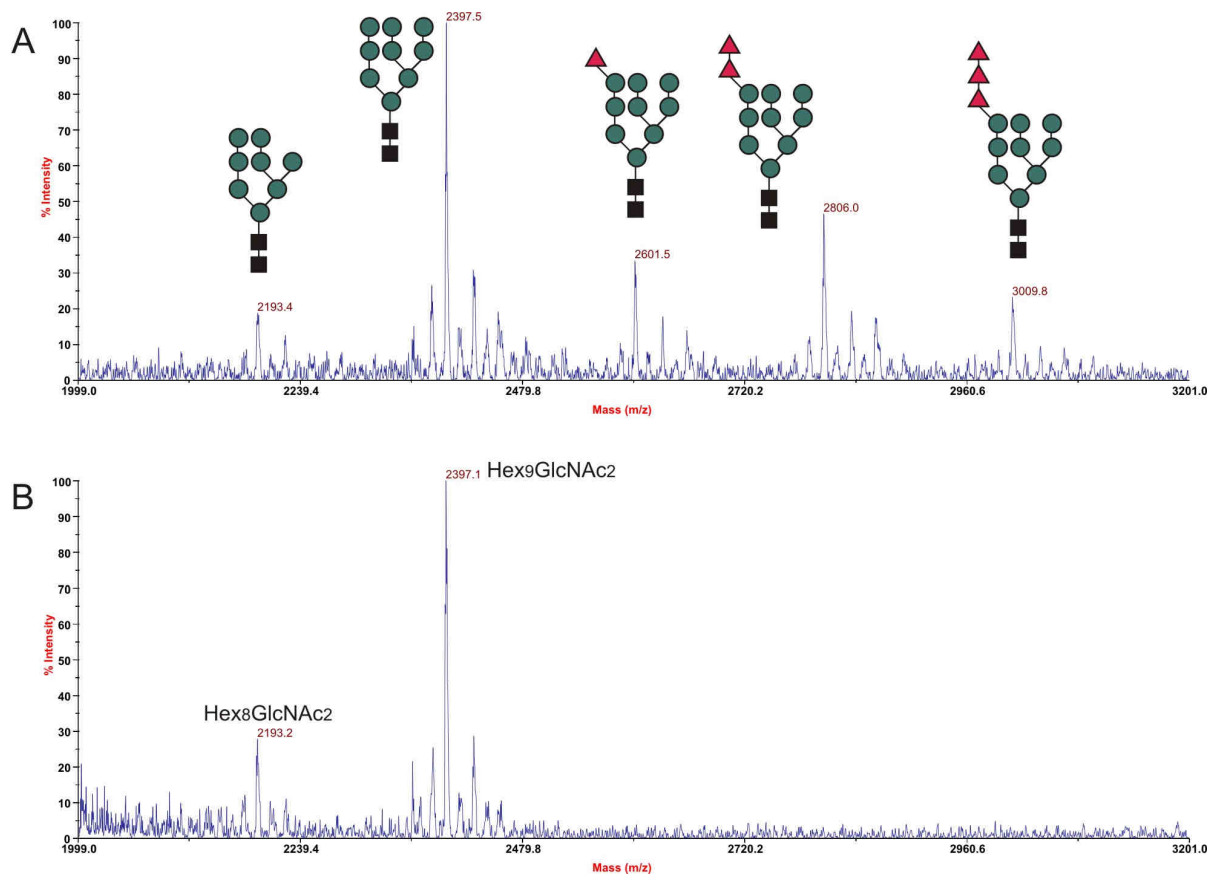
**Figure 12:** Susceptibility of Vero cells derived *N*-Glycans to *A. saitoi* exo-mannosidase digestion. MS profiles of 2-AP derivatized *N*-Glycans (A) before and (B) after treatment with *Aspergillus saitoi* exo-mannosidase.



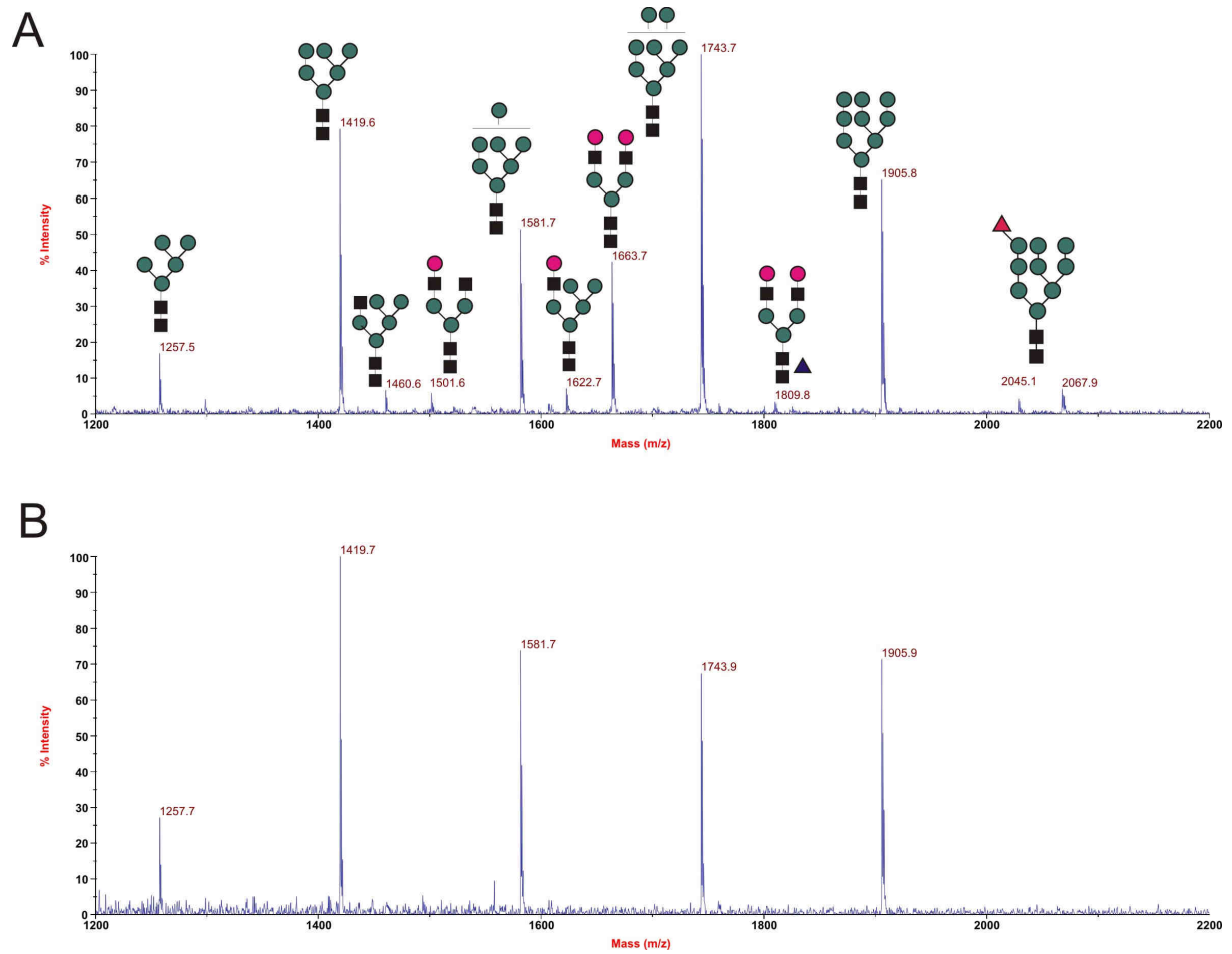
**Figure 1:** Inventory of ALG glycosyltransferases genes and predicted dolichol-linked N-glycans in (A) classical mammalian cell, (B) *T. gondii* and (C) B3F7 mutant cell line.



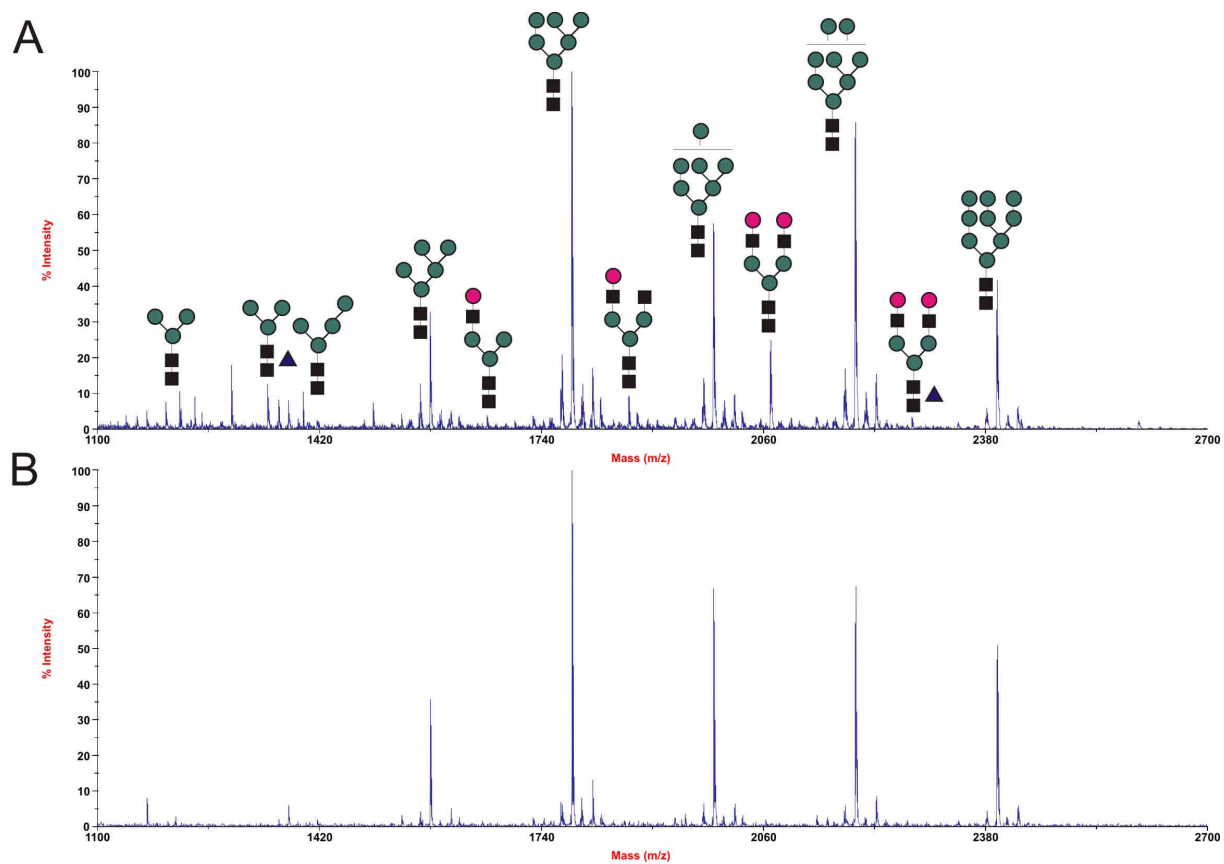
**Figure 2:** Functional complementation of the conditional lethal *S. cerevisiae* strain YPH499-HIS-GAL-ALG7 by the *T. gondii* ALG7. The conditional lethal mutant was transformed with plasmids carrying either the Human ALG7 (HsALG7) or the *T. gondii* ALG7 (*T. gondii*ALG7). The transformed cells were then streaked onto plates containing minimal medium lacking histidine and containing either galactose (SGR) (2) or glucose (SD) (3) and incubated at 30°C.



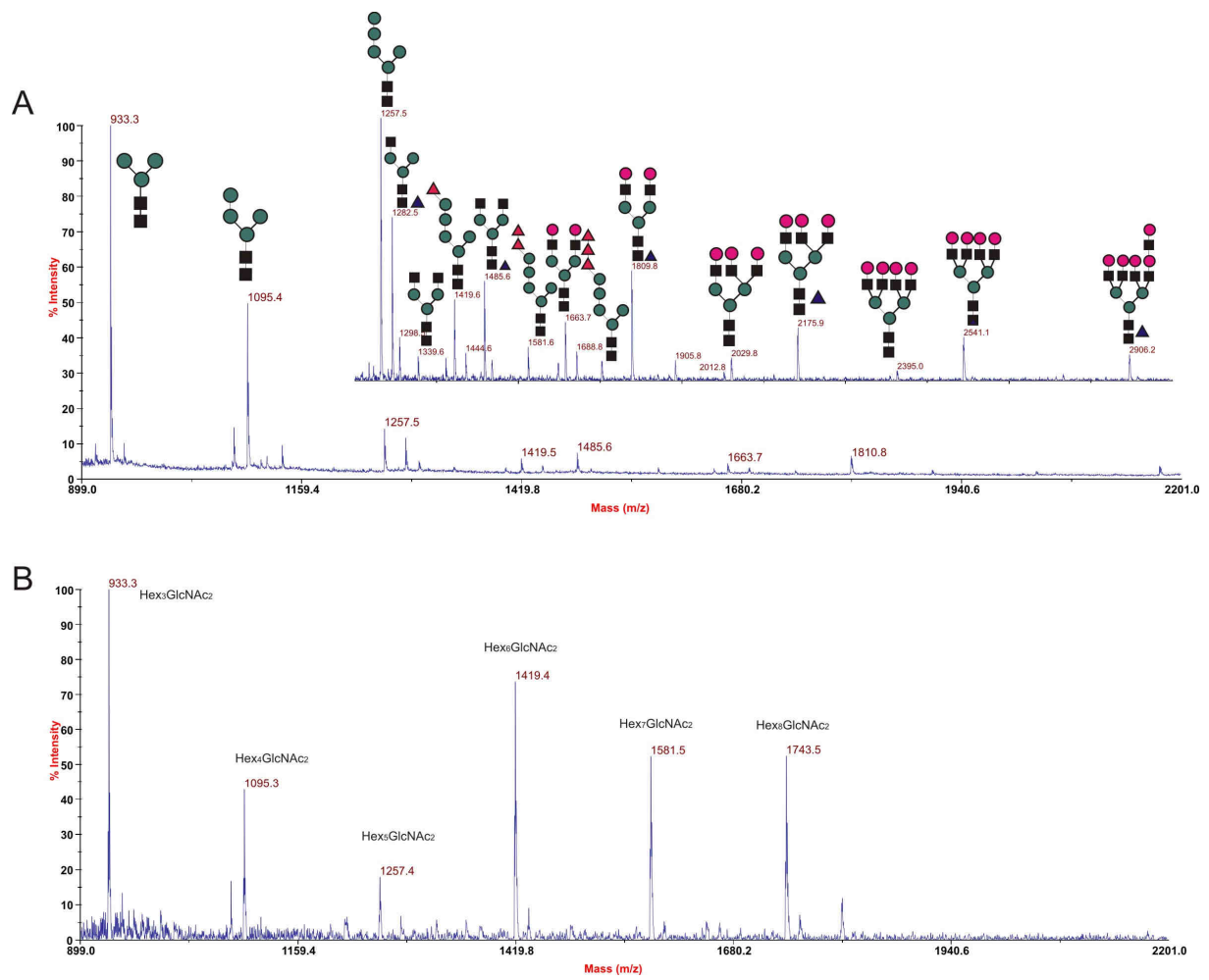
**Figure 3:** MALDI-TOF/MS comparison of permethylated oligosaccharides derived from *DolPPOS* of (A) Vero cells and (B) *T. gondii* grown in Vero cells.



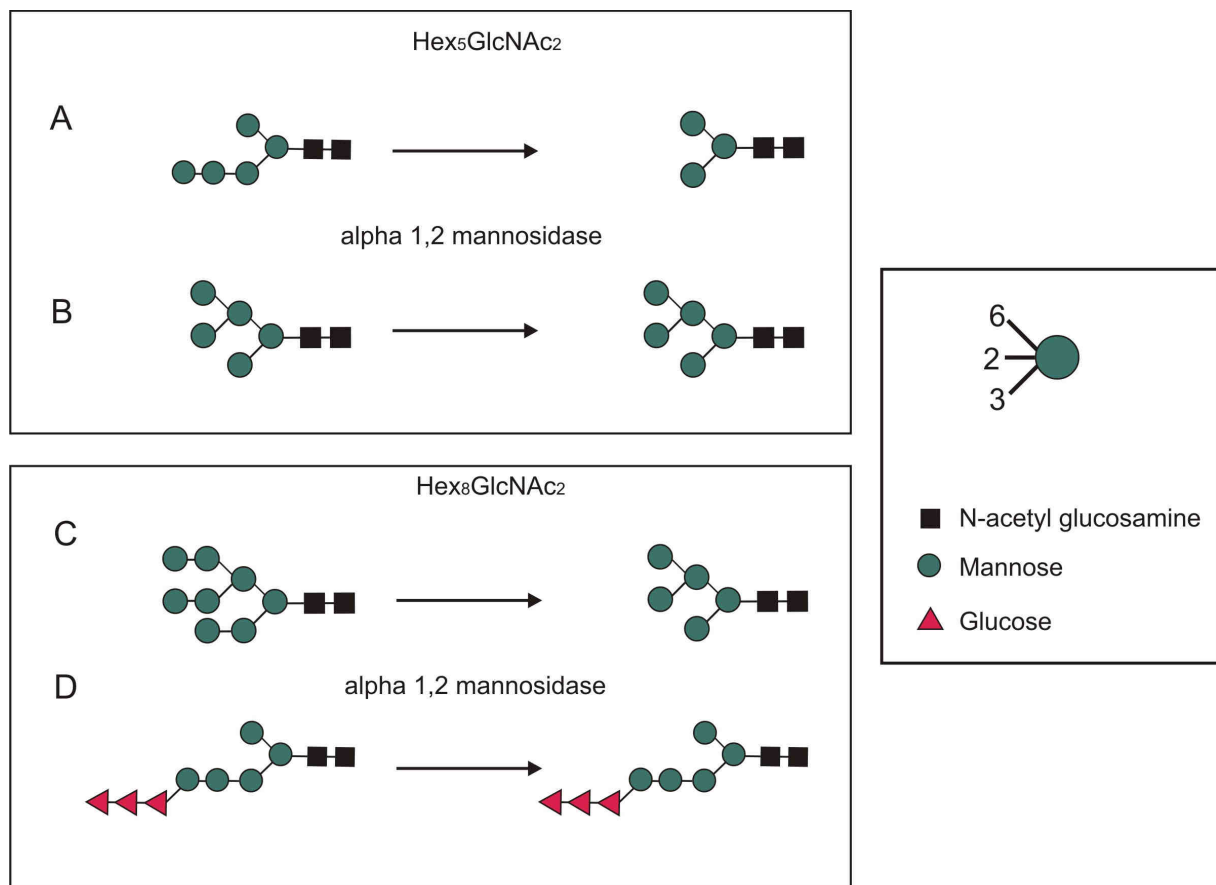
**Figure 4:** MALDI-TOF/MS comparison of native PNGase F released oligosaccharides from (A) Vero cells and (B) *T. gondii* grown in Vero cells.



**Figure 5:** MALDI-TOF/MS comparison of permethylated PNGase F released oligosaccharides from (A) HFF cells and (B) *T. gondii* grown in HFF cells.

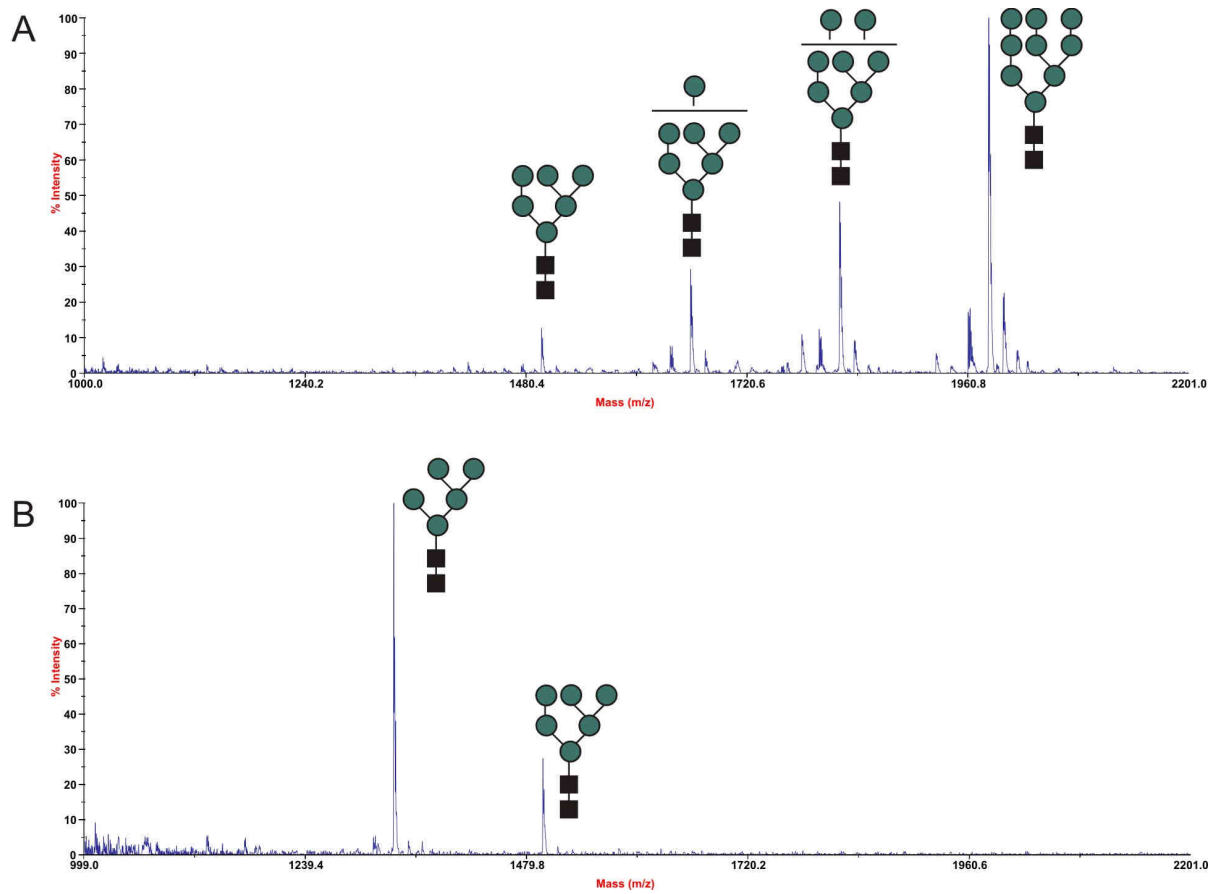


**Figure 6:** MALDI-TOF/MS comparison of native PNGase F released oligosaccharides from (A) B3F7 cells and (B) *T. gondii* grown in B3F7 cells.

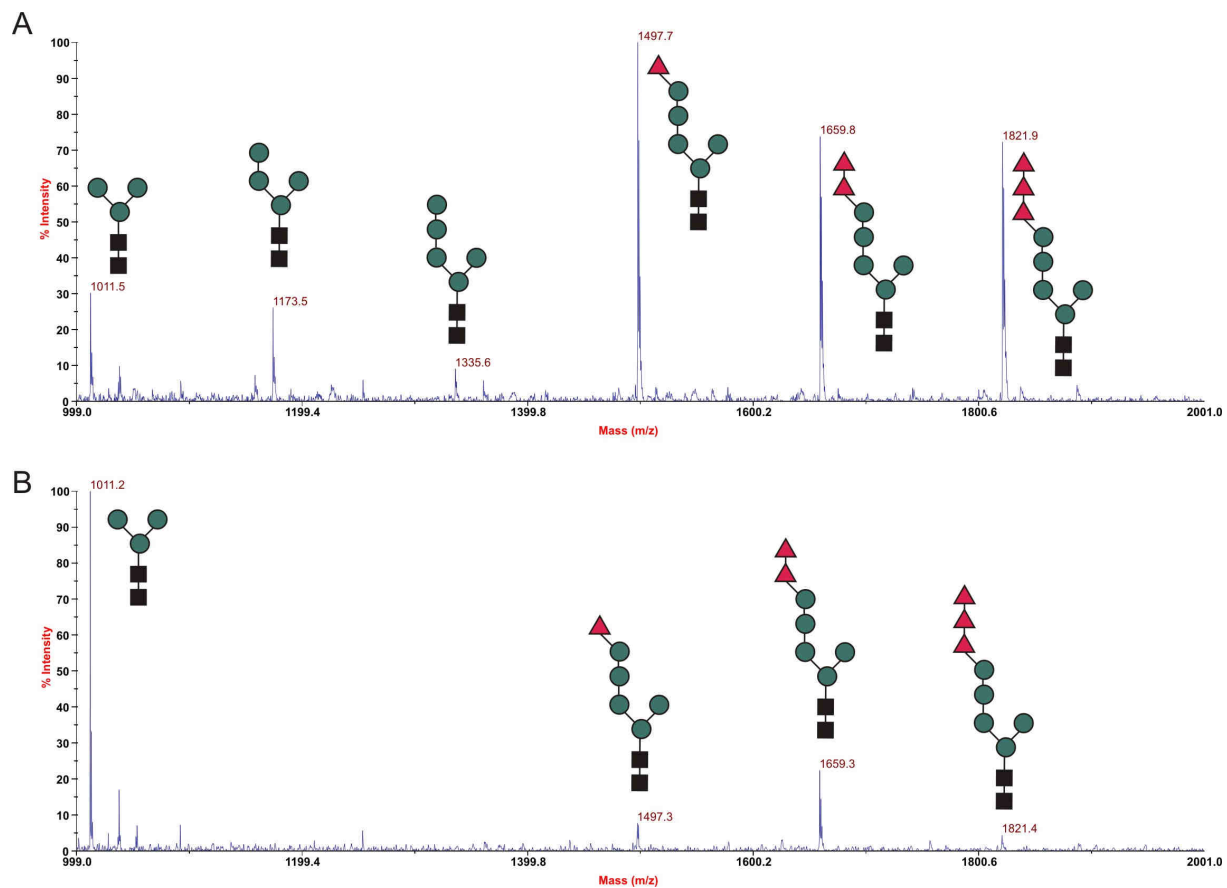


**Figure 7:** Susceptibility to *A. saitoi* exo-mannosidase digestion of (A) biantennary RE-related  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  (B) Golgi-degraded  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  (C) genuine oligomannosyl type N-glycans (D) biantennary, glucose-containing N-glycan.

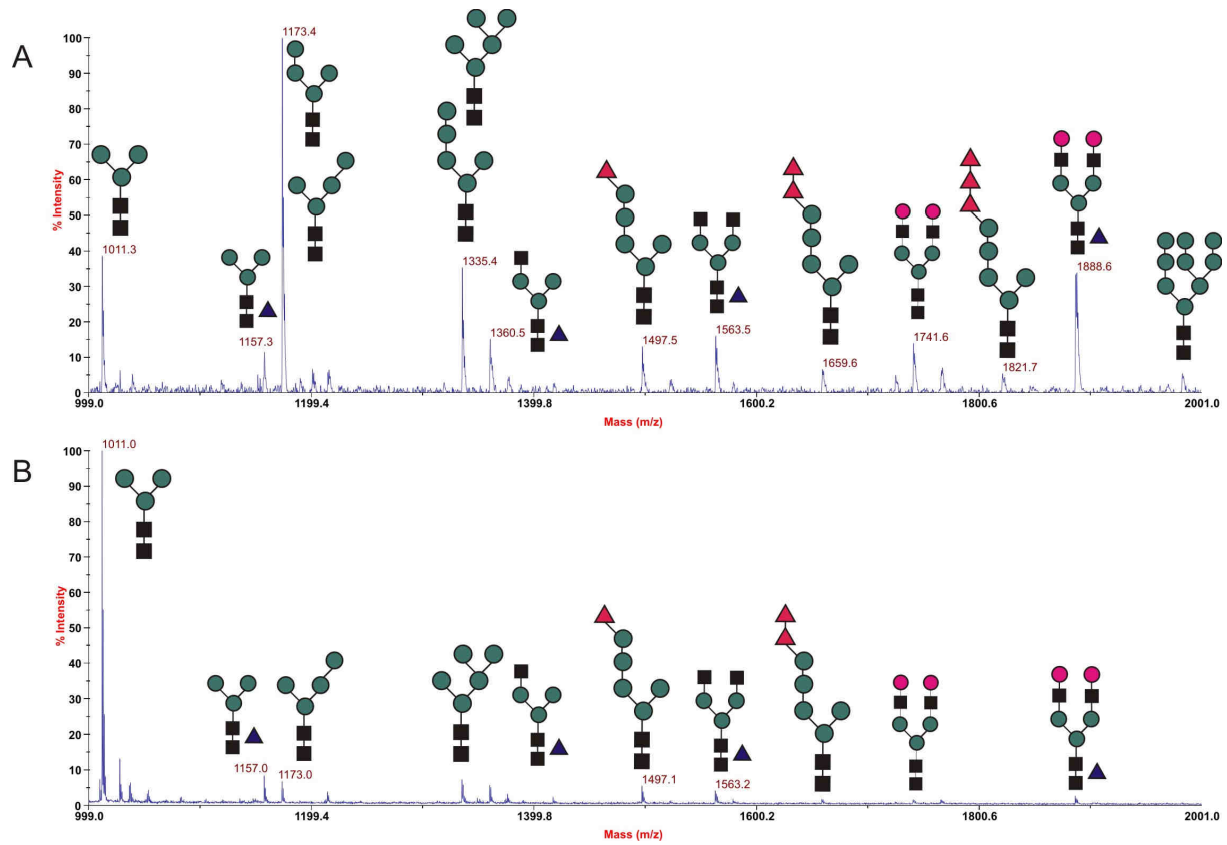




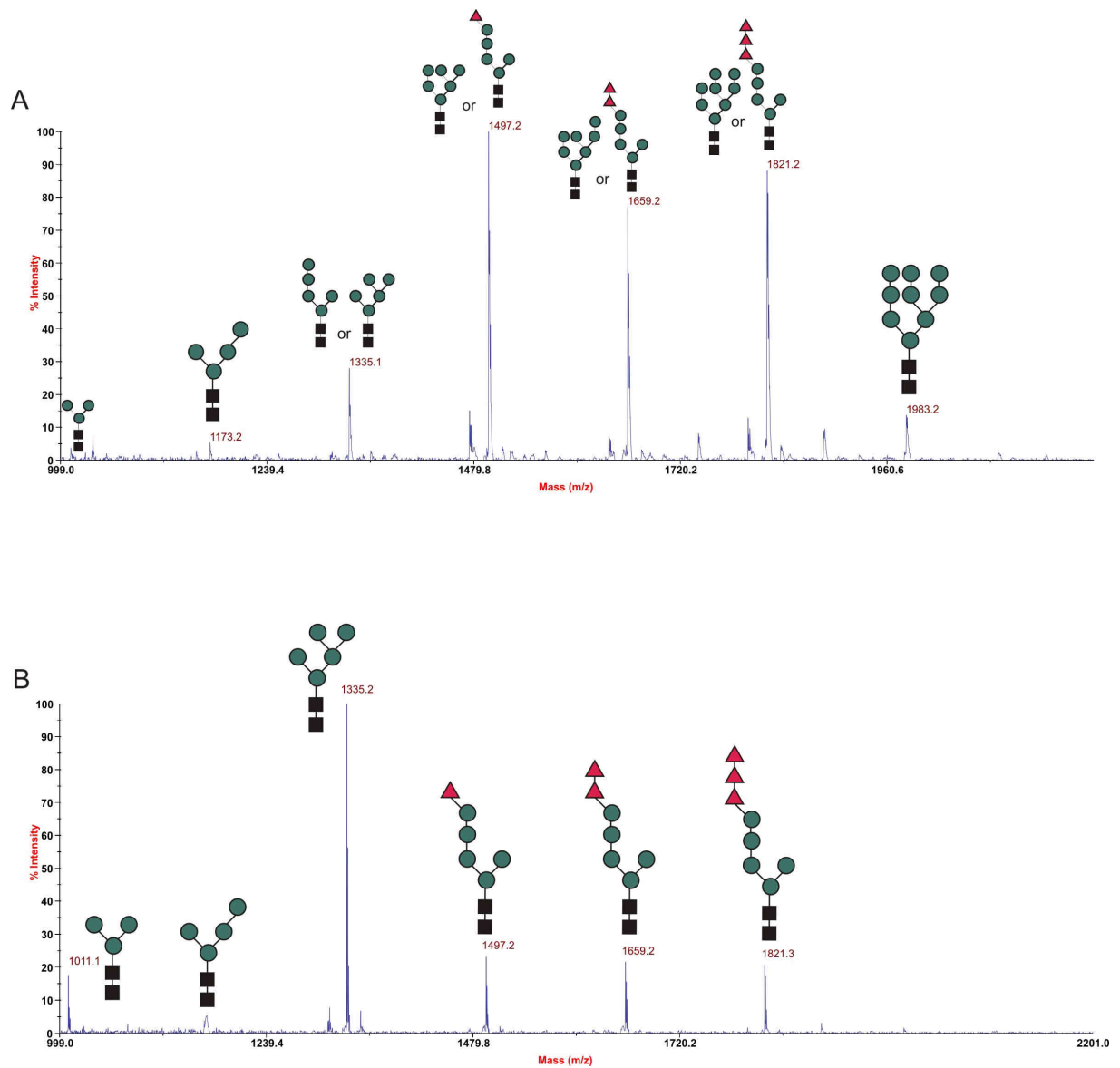
**Figure 8:** Susceptibility of standard branched oligomannosyl-types N-Glycans to *A. saitoi* exo-mannosidase digestion. MS profiles of 2-AP derivatized oligomannosyl-types N-Glycans (A) before and (B) after mannosidase digestion.



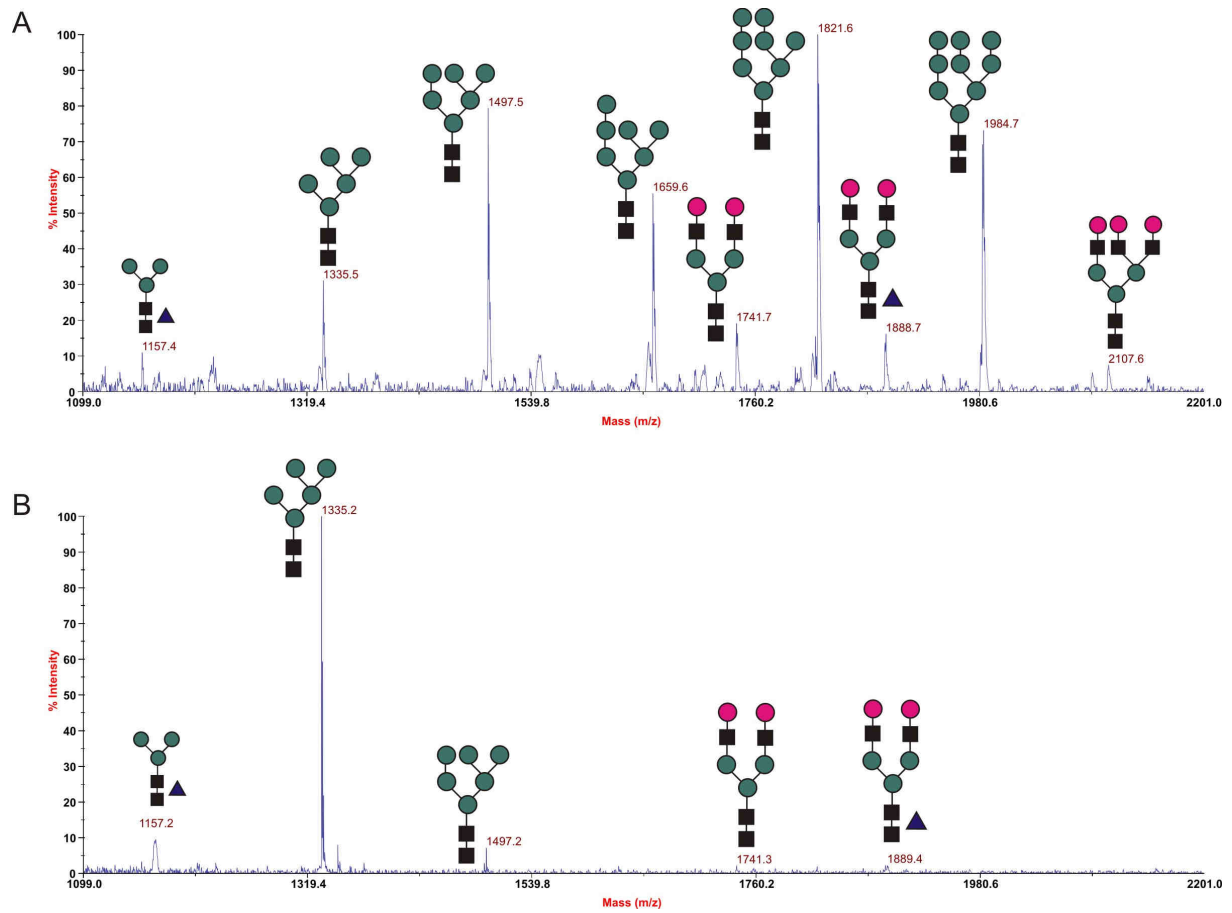
**Figure 9:** MALDI-TOF analyses of PNGase F released oligosaccharides from *T. gondii* grown in CHO B3F7 before (A) and after (B) treatment with *Aspergillus saitoi* exo-mannosidase digestion.



**Figure 10:** MALDI-TOF analyses of PNGase F released oligosaccharides from CHO B3F7 before (A) and after (B) treatment with *Aspergillus saitoi* exo-mannosidase.



**Figure 11:** MALDI-TOF analyses of PNGase F released oligosaccharides from *T. gondii* grown in VERO cells before (A) and after (B) treatment with *Aspergillus saitoi* exo-mannosidase.



**Figure 12:** Susceptibility of Vero cells derived *N*-Glycans to *A. saitoi* exo-mannosidase digestion. MS profiles of 2-AP derivatized *N*-Glycans (A) before and (B) after treatment with *Aspergillus saitoi* exo-mannosidase.

## Materials and methods

### *Cell and parasite cultures*

*T. gondii* grown in African green monkey kidney cells (VERO cells ATCC CCL-81), Human foreskin fibroblasts (HFF; ATCC CRL-1635), CHO Pro-5 and CHO B3F7 were cultured in DMEM (Gibco BRL), supplemented with 10% FCS (Gibco), 2 mM glutamine, 100 units/ml penicillin and 0.1 mg/ml streptomycin. Parasites ( $5 \times 10^7$ ) were added to confluent monolayers cells (T175 cm<sup>2</sup>), harvested after 72 h of cultivation and liberated from their host cells using Mixer Mill homogenizer (Retsch). The suspension was run through a 20 ml glass wool column to remove cellular debris. The purity of the tachyzoite suspension was monitored microscopically. Cell lines and parasites were routinely tested for *Mycoplasma* contamination.

### *Strains and media*

The *S. cerevisiae* and *E. coli* strains used in this work were: YPH 499 [Mat a; *ura* 3-52; *lys* 2-801amber; *ade* 2- 101ochre; *trp* 1- 63; *his* 3- 200; *leu* 2- 1] (Stratagene) and *E. coli* strain XL1-blue (Stratagene), which was used for subcloning and other standard recombinant DNA procedures. *S. cerevisiae* strains were grown in YPAD medium [1% (w/v) Bacto yeast extract, 2% (w/v) Bactopeptone, 2% (w/v) dextrose, 4 mg l<sup>-1</sup> adenine] or SD medium (0.17% Bacto yeast nitrogen base, 0.5% ammonium sulphate and 2% dextrose) containing the nutritional supplements necessary to complement strain auxotrophs or allow selection of transformants. YPH499-HIS-GAL-ALG7 was maintained on SGR medium (4% galactose, 2% raffinose, 0.17% Bacto yeast nitrogen base, 0.5% ammonium sulphate) in which dextrose is replaced by galactose/raffinose as a source of carbohydrates. *E. coli* strains were grown in LB medium.

### *Extraction of glycoproteins and preparation of N-glycans*

Collected *T. gondii* were homogenized by ultrasonic treatment at 4°C. Lipids were extracted by sequential extraction with 20 volumes of chloroform/methanol (2:1, v/v), then with a chloroform/methanol/water (40:20:3) solution. Delipidated homogenates were suspended in a solution of 6 M guanidinium chloride and 5 mM Ethylene Diamine Tetraacetic Acid (EDTA) in 0.1 M Tris/HCl, pH 8, and agitated for 4 h at 4°C. Dithiothreitol was then added to a final concentration of 20 mM and incubated for 5 h at 37°C, followed by the addition of iodoacetamide to a final concentration of 50 mM and further incubated overnight

in the dark at room temperature. Reduced/alkylated sample was dialyzed against water at 4°C for 3 days and lyophilized. The recovered protein samples were then sequentially digested by (TPSK)-treated trypsin overnight at 37°C, in 50 mM ammonium bicarbonate buffer, pH 8.4 and by chymotrypsine.

Crude peptides/glycopeptides were loaded onto a Sep-Pak C18 cartridge. Glucan polymers and other hydrophilic contaminants were washed off with 5% aqueous acetic acid and the bound peptides/glycopeptides were eluted with a step gradient of 20, 40 and 60% 1-propanol in water. Eluted fractions were pooled, dried down and then incubated with *N*-glycosidase F (Roche, Basel, Switzerland) overnight at 37°C in 50 mM ammonium bicarbonate buffer, pH 8.4. Released *N*-glycans were separated from peptides/glycopeptides using the same C18 Sep-Pak procedure. Pooled propan-1-ol fractions were then digested with *N*-glycosidase A from almond (0.5 mU, Calbiochem) in 50 mM ammonium acetate buffer, pH 5, at 37°C overnight. *N*-glycans released were likewise separated from the peptides by the same Sep-pak C18 procedures.

#### *Chemical derivatization*

For MALDI-MS analyses, the glycan samples were permethylated using the NaOH/dimethyl sulfoxide slurry method (Ciucanu and Kerek, 1984), as described by Dell *et al.* (1994). The permethyl derivatives were then extracted in chloroform and repeatedly washed with water.

#### *Mannosidase treatment of 2-aminopyridinylated N-glycans*

PNGase F released-oligosaccharides coupled with 2-PA (see related protocols) were digested with alpha-Mannosidase from *Aspergillus saitoi* (GKX5009 Glyko®). Each sample was treated with  $\alpha(1,2)$  mannosidase in 100 mM sodium acetate, 2mM Zn<sup>2+</sup> pH 5.0, and incubated overnight at 37°C. The mixture was finally applied on a Sep-Pak C18 to purify 2-aminopyridinylated oligosaccharides.

#### *Coupling oligosaccharides with 2-aminopyridine*

After hydrolysis, oligosaccharides were reductively aminated with 2-aminopyridine at the reducing end (according to Hase, 1994). Then, to remove excess reagent and purify 2-PA oligosaccharides, two methanol solutions (75% and 85%) are successively added to the reactional mixture and dry under a nitrogen stream. After adding 1ml water, pH is adjusted at 10 by adding NH<sub>4</sub>OH (25%). Aqueous phase is washed 10 times with chloroform to eliminate

excess 2-AP. Aqueous phase is then transferred into a clean tube and pH neutralized with glacial acetic acid before lyophilization. Finally, derivatized oligosaccharides are purified by SPE onto a Sep-Pack C18 column.

#### *Mannosidase treatment of 2-aminopyridinylated N-glycans*

2-PA coupled PNGase F released-oligosaccharides were digested with alpha-Mannosidase from *Aspergillus saitoi* (GKX5009 Glyko®). Each sample was treated with  $\alpha(1,2)$  mannosidase in 100 mM sodium acetate, 2mM Zn<sup>2+</sup> pH 5.0, and incubated overnight at 37°C. The mixture was finally applied on a Sep-Pak C18 to purify 2-aminopyridinylated oligosaccharides.

#### *MS analyses of glycans*

For MALDI-time-of-flight (MALDI-TOF) MS glycan profiling, native compounds in water were mixed 1:1 with 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) matrix (10 mg/mL in MeOH/Water 50:50) spotted on the target plate and dried under vacuum. Data acquisition was performed manually on a Voyager (Applied biosystem) operated in the reflectron mode. Laser shots were accumulated until a satisfactory signal to noise ratio was achieved when combined and smoothed.

#### *Extraction of Lipid Linked Oligosaccharides*

Extractions were performed according to Villers *et al.*, 1994. Briefly, cell pellets were extracted with 2ml of chloroform/methanol/H<sub>2</sub>O (3:2:1). After centrifugation, upper phase and proteins were extracted twice with 1.5 mL of theoretical lower phase (MeOH 70mL, MgCl<sub>2</sub> 4mM 5mL, chloroform 430mL). Then proteins were washed 4 times with 3 mL of theoretical upper phase (MeOH 240mL, H<sub>2</sub>O 225mL, MgCl<sub>2</sub> 100mM 9.4mL, CH<sub>3</sub>Cl<sub>3</sub> 15mL). After partial drying of pellets Dol-PP-OS were extracted by 1.5 mL of CH<sub>3</sub>Cl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O (10:10:3; v/v) mixture. Dried Dol-PP-OS were hydrolysed by THF/H<sub>2</sub>O/HCl (9:1:0.083; v/v) at 50°C for 2h. Released oligosaccharides are dried under a stream of nitrogen and purified on a carbograph column (Alltech carbograph SPE Column).



## References

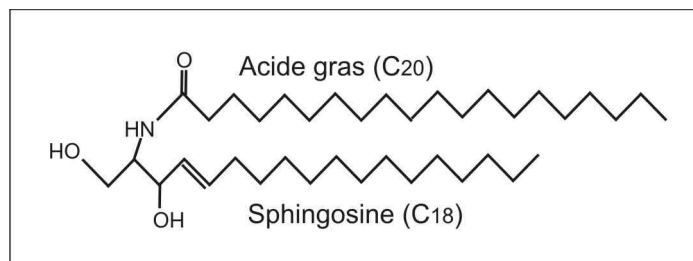
- Banerjee S, Vishwanath P, Cui J, Kelleher DJ, Gilmore R, Robbins PW, Samuelson J (2007) *Proc Natl Acad Sci* 104(28):11676-81.
- Carruthers BV (1999) *Parasitol. Int.* 48:1-10.
- Charron AJ, Sibley LD. (2002) *J Cell Sci.* 115(Pt 15):3049-59.
- Coppens I, Joiner KA. (2001) *Expert Rev Mol Med.* 15:1-20.
- Coppens I, Sinai AP, Joiner KA (2000) *J Cell Biol.* 149(1):167-80.
- de Melo EJ, de Carvalho TU, de Souza W. (1992) *Cell Struct Funct.* 17(5):311-7.
- Dell A, Reason A, Khoo K, Panico M, McDowell R, Morris HR (1994) *Methods Enzymol.* 230, 108–132.
- Duvet S, Labiau O, Mir AM, Kmiecik D, Krag SS, Verbert A, Cacan R (1998) *Biochem J.* 335:389-96.
- Duvet S, Chirat F, Mir AM, Verbert A, Dubuisson J, Cacan R. (2000) *Eur J Biochem.* 267:1146-52.
- Endo T, Pelster B, Piekarski G (1981) *Z Parasitenkd* 65(2):121-9.
- Fiedler, K. and Simons K. (1995) *Cell* 81(3): 309-12.
- Gao N, Lehrman MA. (2002) *Glycobiology* 12(5):353-60.
- Gowda DC, Gupta P, Davidson EA. (1997) *J Biol Chem* 272(10):6428-39.
- Hammond, C. and Helenius A. (1995) *Curr Opin Cell Biol* 7(4): 523-9.
- Handman, E., Goding J.W. and Remington J.S. (1980) *J Immunol* 124(6): 2578-83.
- Hase S. (1994) *Meth. Enzymol* 230: 225-37.
- Helenius, A. and Aebi M. (2004) *Annu Rev Biochem* 73: 1019-49.
- Johnson, A.M., McDonald P.J. and Neoh S.H. (1981) *Biochem Biophys Res Commun* 100(3): 934-43.
- Jones, J.L., Lopez A., Wilson M., Schulkin J. and Gibbs R. (2001) *Obstet Gynecol Surv* 56(5): 296-305.
- Katinka MD, Duprat S, Cornillot E, Metenier G, Thomarat F, Prensier G, Barbe V, Peyretilade E, Brottier P, Wincker P, Delbac F, El Alaoui H, Peyret P, Saurin W, Gouy M, Weissenbach J, Vivares CP. (2001) *Nature* 414(6862):450-3.

- Kelleher DJ, Banerjee S, Cura AJ, Samuelson J, Gilmore R. (2007) *J Cell Biol.*, 177(1):29-37.
- Klaren, V.N and Kijlstra A (2002) *Ocul Immunol Inflamm* 10(1): 1-26.
- Kravetz, J.D. and Federman D.G. (2005) *Infect Dis Obstet Gynecol* 13(3): 161-5.
- Kornfeld, R. and Kornfeld S. (1985) *Annu Rev Biochem* 54: 631-64.
- Lehle, L., Eiden A., Lehnert K., Haselbeck A. and Kopetzki E. (1995) *FEBS Lett* 370(1-2): 41-5.
- Luft, B.J. and Remington J.S. (1982) *Infect Immun* 38(3): 1164-71.
- Luft, B.J., Naot Y., Araujo F.G., Stinson E.B. and Remington J.S. (1983) *Ann Intern Med* 99(1): 27-31
- Luft BJ, Remington JS. (1992) *Clin Infect Dis.* 15: 211-22.
- Mauras, G., Dodeur M., Laget P., Senet J.M. and Bourrillon R. (1980) *Biochem Biophys Res Commun* 97(3): 906-12.
- Mordue DG, Hakansson S, Niesman I, Sibley LD. (1999) *Exp Parasitol.* 92(2):87-99.
- Neuen-Jacob, E., Figge C., Arendt G., Wendtland B., Jacob B. and Wechsler W. (1993) *Int J Legal Med* 105(6): 339-50.
- Odenthal-Schnittler M, Tomavo S, Becker D, Dubremetz JF, Schwarz RT. (1993) *Biochem J.* 291: 713-21.
- Oriol R, Martinez-Duncker I, Chantret I, Mollicone R, Codogno P (2002) *Mol Biol Evol.* 19(9):1451-63.
- Parodi AJ., (1993) *Glycobiology* 3(3):193-9. Review.
- Parodi AJ. (2000) *Annu Rev Biochem* 69: 69-93.
- Samuelson J, Banerjee S, Magnelli P, Cui J, Kelleher DJ, Gilmore R, Robbins PW (2005) *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(5):1548-53.
- Schwartzman JD, Pfefferkorn ER (1982) *Exp Parasitol.* 53(1):77-86.
- Schwarz, R.T. and Datema R. (1982) *Adv Carbohydr Chem Biochem* 40: 287-379.
- Shams-Eldin H, Blaschke T, Anhlan D, Niehus S, Muller J, Azzouz N, Schwarz RT. (2005) *Mol Biochem Parasitol.* 143(1):6-11.
- Sharma, S.D., Mullenax J., Araujo F.G., Erlich H.A. and Remington J.S. (1983) *J Immunol* 131(2): 977-83.
- Sinai AP, Webster P, Joiner KA. (1997) *J Cell Sci.* 110 (Pt 17):2117-28.

- Sinai AP, Joiner KA. (2001) *J Cell Biol.* 154(1):95-108.
- Stoll, J. (1986) PhD Thesis. School of Hygiene and Public Health, The Johns Hopkins University, Baltimore, MD, USA.
- Taupin V, Garenaux E, Mazet M, Maes E, Denise H, Prensier G, Vivares CP, Guerardel Y, Metenier G. (2007) *Glycobiology* 17(1):56-67.
- Villers C, Cacan R, Mir AM, Labiau O, Verbert A (1994) *Biochem J.*298 ( Pt 1):135-42.
- Wheeler SF, Harvey DJ (2000) *Anal Chem* 72(20):5027-39.
- Wichroski MJ, Ward GE (2003) *Eukaryot Cell* 2(5):1132-6.
- Wirth, D.F., Lodish H.F. and Robbins P.W. (1979) *J Cell Biol* 81(1): 154-62.
- Yagodnik C., De la Canal L., Parodi AJ. (1987) *Biochemistry* 26: 5937-5943.
- Zinecker, C.F., Striepen B., Geyer H., Geyer R., Dubremetz J.F. and Schwarz R.T. (2001) *Mol Biochem Parasitol* 116(2): 127-35.
- Zufferey R, Knauer R, Burda P, Stagljar I, te Heesen S, Lehle L, Aebi M. (1995) *EMBO J.* 14(20):4949-60

## 2.2 Etude préliminaire des glycosphingolipides de *T. gondii*

Dans le cadre de l'étude des glycoconjugués produits par *T. gondii*, nous avons effectué des travaux préliminaires concernant la présence chez ce parasite de glycosphingolipides. Les glycolipides sont les constituants majeurs des membranes cellulaires, ils sont impliqués dans de nombreuses fonctions, incluant la reconnaissance cellulaire, les contacts cellule-cellule, l'adressage membranaire ainsi que des fonctions de récepteur de surface (Kopitz, 1997). Les glycosylphosphatidylinositols (GPI) constituent les glycolipides majeurs chez les protozoaires. Ils ont été identifiés comme des déterminants très immunogènes chez la forme tachyzoïte de *T. gondii* (Striepen et al., 1997; Lekutis et al., 2001; Zinecker et al., 2001). L'autre grande classe de glycolipides présente dans les cellules eucaryotes, les glycosphingolipides (GSL) n'a pas encore été décrite chez *T. gondii*. Tous les GSL partagent une architecture commune. Les céramides sont les composants lipidiques principaux, présents dans la sphingomyéline, les glycolipides complexes, les cérébrosides et les gangliosides. Les céramides sont constitués d'une longue chaîne de base, généralement la sphingosine, liée à un acide gras *via* une liaison amide (figure 15) (Leverly, 2005).



**Figure 15 :** Structure d'un céramide.

Cette partie céramide peut être substituée par différents monosaccharides tels que le Glc, Gal, GlcNAc, GalNAc et NeuAc. En fonction de l'enchaînement de ces monosaccharides, on définit différentes séries de glycosphingolipides (Tableau 1).

<i>Nom (série)</i>	<i>Structure de base</i>
Gala	Gal( $\alpha$ 1,4)Gal( $\beta$ 1)Cer
sulfatide	3-O-Sulfo-Gal( $\beta$ 1)Cer
Muco	Gal( $\beta$ 1,3)Gal( $\beta$ 1,3)Gal( $\beta$ 1,4)Glc( $\beta$ 1)Cer
lacto	Gal( $\beta$ 1,3)GlcNAc( $\beta$ 1,3)Gal( $\beta$ 1,4)Glc( $\beta$ 1)Cer
néolacto	Gal( $\beta$ 1,4)GlcNAc( $\beta$ 1,3)Gal( $\beta$ 1,4)Glc( $\beta$ 1)Cer
globo	GalNAc( $\beta$ 1,3)Gal( $\alpha$ 1,4)Gal( $\beta$ 1,4)Glc( $\beta$ 1)Cer
isoglobo	GalNAc( $\beta$ 1,3)Gal( $\alpha$ 1,3)Gal( $\beta$ 1,4)Glc( $\beta$ 1)Cer
ganglio	Gal( $\beta$ 1,3)GalNAc( $\beta$ 1,4)Gal( $\beta$ 1,4)Glc $\beta$ 1Cer

**Tableau 1 :** définition des différentes séries de glycosphingolipides présentes chez les mammifères (D'après Hakomori, 1983).

La biosynthèse des GSL est bien définie chez les mammifères (Kopitz, 1997). La présence de GSL chez la forme tachyzoïte de *T. gondii* a été suggérée par plusieurs études. En effet, les travaux d'Azzouz et collaborateurs suggèrent une capacité de biosynthèse *de novo* de glycolipides ainsi que la présence à la surface du parasite de composés sensibles à l'endoceramidase (Azzouz *et al.*, 2002). Outre cette capacité de biosynthèse, il semble que le parasite pourrait importer puis utiliser des céramides provenant de la cellule-hôte (de Melo et de Souza, 1996; Mordue *et al.*, 1999). L'import de composés lipidiques tel que le cholestérol ou autres lipides neutres a également été reporté (Coppens *et al.*, 2000; Charron and Sibley, 2002; Coppens and Joiner, 2001). Jusqu'à présent, outre les ancrés GPI, les seules structures de glycolipides caractérisées chez *T. gondii* sont des monogalactosyldiacylglycérol et digalactosyldiacylglycérol, similaires aux structures décrites chez les plantes (Maréchal *et al.*, 2002). Bien que la biosynthèse de ces composés soit liée à celle des céramides (Sonda *et al.*, 2005), leur composante lipidique n'est pas un céramide mais un monoacylglycérol.

Les glycolipides isolés des cellules VERO et des tachyzoïtes ont été purifiés puis analysés en tant que produits natifs et perméthylés par MALDI-MS. Les profils de GSL entre parasite et cellule hôte sont identiques, seules les quantités relatives des composés présents semblent varier (Figure 16 A et B ; Tableau 2). Les glycosphingolipides peuvent différer en fonction de leur composition en monosaccharides, mais aussi en fonction de la partie céramide qui les constitue. Ainsi, afin de lever toute ambiguïté, la partie glycanique a été analysée seule après traitement par une endoceramidase (Figure 16 C,D et E ; Tableau 3). De la même façon, les profils entre cellule hôte et parasite sont très similaires. Les glycannes isolés correspondent à des structures classiquement décrites chez les mammifères, tel que la

séquence NeuAcHex<sub>2</sub> (m/z=838) qui correspond au ganglioside GM<sub>3</sub>. Ainsi, de façon surprenante, on note la présence de composés sialylés chez *T. gondii*, alors que la présence d'acide sialique n'a jamais été mise en évidence chez ce parasite.

L'observation d'un clivage sur la cible lors de l'analyse MALDI-MS (Figure 17 A) ainsi que la fragmentation de différents composés par ESI-MS/MS (Figure 17 B et C) nous a permis de déterminer la masse des céramides constituant les différents glycosphingolipides. En effet, les signaux à m/z 548 et 658 obtenu par clivage de la partie céramide en MALDI-MS correspondent aux signaux obtenus après fragmentation des composés à m/z = 1010 et m/z = 1120 respectivement. L'obtention par MALDI-MS des profils de GSL ainsi que de la partie glycanique isolée après digestion par endocéramidase nous a permis d'obtenir les masses des différents céramides présents en mélange. La comparaison des masses obtenues lors de l'analyse des produits natifs et perméthylés nous a permis de déterminer le nombre de fonction hydroxyles présentes. Sur la base d'une structure comportant une sphingosine, nous avons attribué aux différents céramides les compositions suivantes :

Composition	Cer <sup>a</sup>	Cer <sup>b</sup>	Cer <sup>c</sup>	Cer <sup>d</sup>
Sphingoïne	Sphingosine (C <sub>18</sub> )			
Acide gras	C <sub>16:2</sub>	C <sub>18:2</sub>	C <sub>20:2</sub>	C <sub>24:3</sub>

Caractérisation des céramides. C<sub>n:m</sub> : n correspond au nombre de carbone, n au nombre d'insaturation.

La présence de différents céramides apporte une diversité structurale supplémentaire. La longueur de l'acide gras attaché à la sphingosine par une liaison amide varie d'un C<sub>16</sub> à un C<sub>24</sub>, de même que son degré d'insaturation ou d'hydroxylation peut différer. Cette attribution n'a été faite que sur la base de la comparaison des masses natives et perméthylées. Cependant, des analyses en CPG nous permettront de vérifier la nature exacte des acides gras constituant ces céramides.

Malgré la possibilité de diversité structurale des glycosphingolipides apportée à la fois par la partie céramide, mais aussi par la partie oligosaccharidique, les composés purifiés chez *T. gondii* sont identiques aux composés isolés de la cellule-hôte. Ils comprennent en particulier des structures sialylées, très originaux puisque la présence d'acide sialique chez *T. gondii* n'a jamais été démontrée.

Ces travaux constituent une étude préliminaire, de nombreuses informations structurales restent à collecter afin d'établir sans ambiguïté la nature des glycolipides purifiés. Toutefois, l'observation chez *T. gondii* de glycosphingolipides strictement identiques aux composés de la cellule-hôte est à considérer avec précaution. En effet, il a été établi que le parasite pouvait synthétiser *de novo* des glycosphingolipides complexes (Azzouz *et al.*, 2002), ou récupérer des précurseurs lipidiques pouvant être ensuite métabolisés (de Melo and de Souza, 1996; Mordue *et al.*, 1999). En revanche, le fait que les profils entre hôte et parasite soient identiques et qu'en particulier on observe la présence de résidus d'acide sialique, jamais décrit chez *T. gondii*, implique quelques précautions quant aux conclusions de ces travaux. Aussi, dans le but de valider ces résultats, nous avons débuté une collaboration avec le Dr JF Dubremetz (UMR CNRS 5539, Montpellier) dont l'expertise devrait nous permettre de vérifier la présence à la surface du parasite de structures glycolipidiques sialylées. En effet, un marquage à la surface du tachyzoïte dans sa forme intracellulaire par des lectines fluorescentes spécifiques des acides sialiques est envisageable. Seules des expériences mettant en évidence *in vivo* la présence de ces structures à la surface du parasite nous permettra de valider les résultats structuraux obtenus.

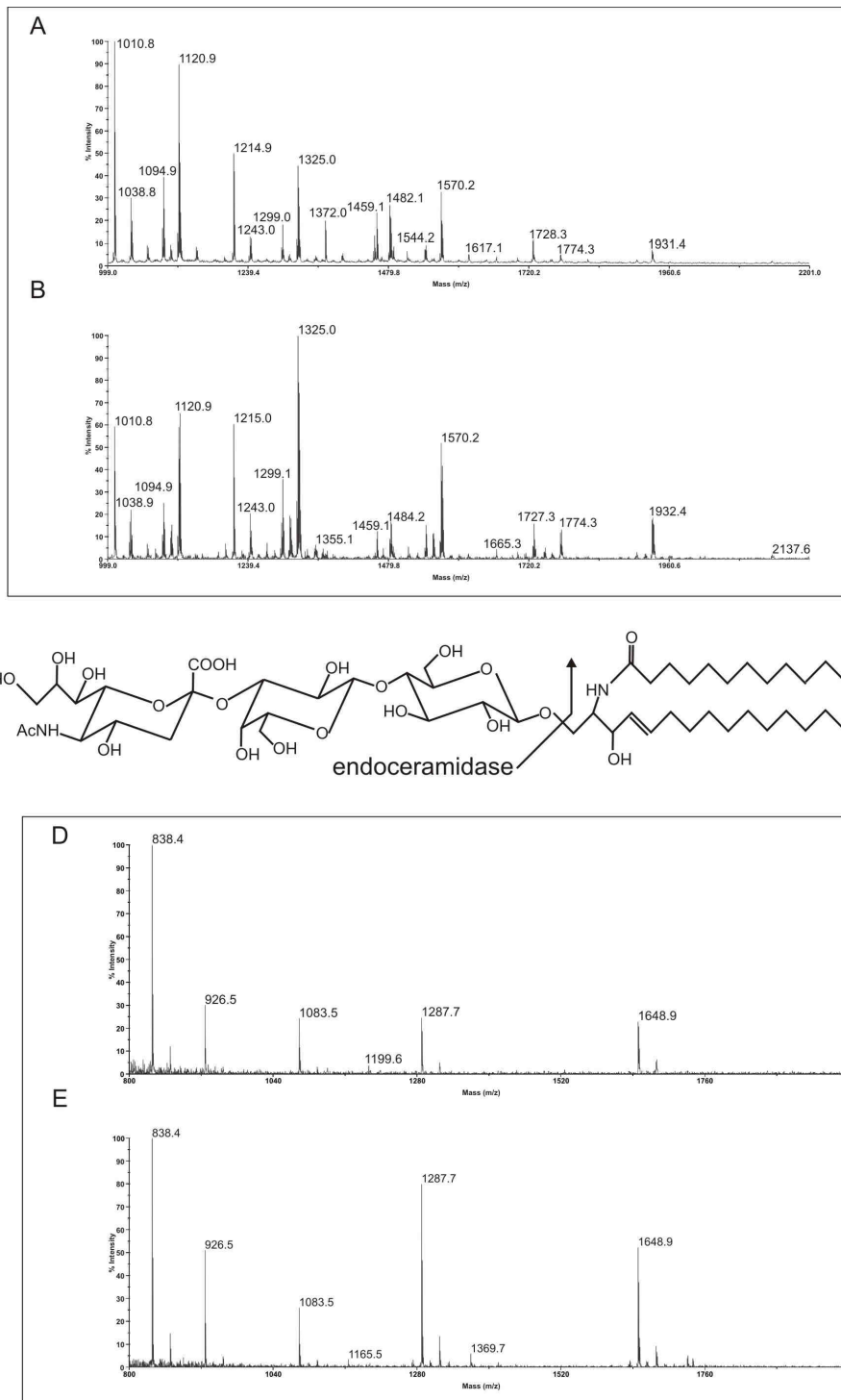
**Tableau 2:** Analyse des glycolipides par MALDI-TOF MS. (\*) Signal correspondant à  $[M+H]^+$ 

<i>Signal (m/z)</i> $[M+Na]^+$ (permethylés)	<i>Signal (m/z)</i> $[M+Na]^+$ (natifs)	<i>Composition</i>
548.5 <sup>(*)</sup>	520.4 <sup>(*)</sup>	Cer <sup>a</sup>
576.5 <sup>(*)</sup>	548.5 <sup>(*)</sup>	Cer <sup>b</sup>
632.6 <sup>(*)</sup>	604.6 <sup>(*)</sup>	Cer <sup>c</sup>
658.6 <sup>(*)</sup>	630.6 <sup>(*)</sup>	Cer <sup>d</sup>
806.5	722.5	Hex <sub>1</sub> Cer <sup>a</sup>
834.8	750.6	Hex <sub>1</sub> Cer <sup>b</sup>
890.9	806.6	Hex <sub>1</sub> Cer <sup>c</sup>
916.8	832.7	Hex <sub>1</sub> Cer <sup>d</sup>
1010.8	884.6	Hex <sub>2</sub> Cer <sup>a</sup>
1038.8	912.7	Hex <sub>2</sub> Cer <sup>b</sup>
1094.9	969.6	Hex <sub>2</sub> Cer <sup>c</sup>
1120.9	996.8	Hex <sub>2</sub> Cer <sup>d</sup>
1214.9	1046.7	Hex <sub>3</sub> Cer <sup>a</sup>
1242.9	1074.7	Hex <sub>3</sub> Cer <sup>b</sup>
1299.0	1130.8	Hex <sub>3</sub> Cer <sup>c</sup>
1325.0	1156.7	Hex <sub>3</sub> Cer <sup>d</sup>
1372.0	nd	NeuAcHex <sub>2</sub> Cer <sup>a</sup>
1400.0	nd	NeuAcHex <sub>2</sub> Cer <sup>b</sup>
1456.1	nd	NeuAcHex <sub>2</sub> Cer <sup>c</sup>
1460.1	1249.7	Hex <sub>3</sub> HexNAc <sub>1</sub> Cer <sup>a</sup>
nd	1277.8	Hex <sub>3</sub> HexNAc <sub>1</sub> Cer <sup>b</sup>
1482.1	nd	NeuAcHex <sub>2</sub> Cer <sup>d</sup>
1544.1	1333.9	Hex <sub>3</sub> HexNAc <sub>1</sub> Cer <sup>c</sup>
1570.2	1359.8	Hex <sub>3</sub> HexNAc <sub>1</sub> Cer <sup>d</sup>
1616.1	nd	NeuAcHex <sub>2</sub> HexNAc <sub>1</sub> Cer <sup>a</sup>
1664.2	1411.8	Hex <sub>4</sub> HexNAc <sub>1</sub> Cer <sup>a</sup>
1726.3	nd	NeuAcHex <sub>2</sub> HexNAc <sub>1</sub> Cer <sup>d</sup>
1774.3	1521.9	Hex <sub>4</sub> HexNAc <sub>1</sub> Cer <sup>d</sup>
1931.3	nd	NeuAcHex <sub>3</sub> HexNAc <sub>1</sub> Cer <sup>d</sup>
2135.6	nd	NeuAcHex <sub>4</sub> HexNAc <sub>1</sub> Cer <sup>d</sup>
2182.5	nd	NeuAc <sub>2</sub> Hex <sub>3</sub> HexNAc <sub>1</sub> Cer <sup>a</sup>
2266.6	nd	NeuAc <sub>2</sub> Hex <sub>3</sub> HexNAc <sub>1</sub> Cer <sup>c</sup>
2292.7	nd	NeuAc <sub>2</sub> Hex <sub>3</sub> HexNAc <sub>1</sub> Cer <sup>d</sup>

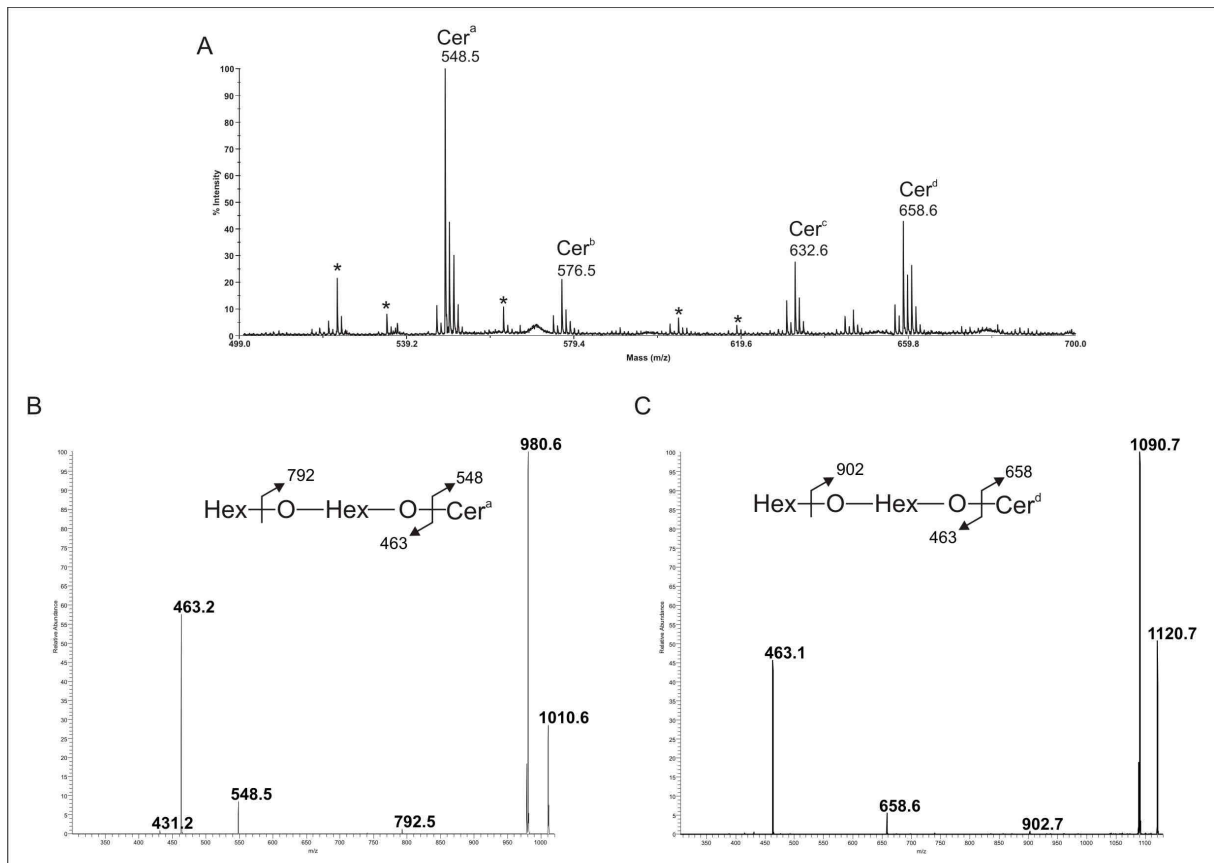


**Tableau 3:** Analyse par MALDI-TOF MS des oligosaccharides libérés après digestion des glycosphingolipides par l'endoglycosylceramidase II.

<i>Signal (m/z)</i> <i>[M+Na]<sup>+</sup></i> <i>(perméthylés)</i>	<i>Composition</i>
838.3	NeuAcHex <sub>2</sub>
926.4	Hex <sub>3</sub> HexNAc <sub>1</sub>
1083.5	NeuAcHex <sub>2</sub> HexNAc <sub>1</sub>
1130.5	Hex <sub>4</sub> HexNAc <sub>1</sub>
1287.5	NeuAcHex <sub>3</sub> HexNAc <sub>1</sub>
1491.7	NeuAcHex <sub>4</sub> HexNAc <sub>1</sub>
1648.7	NeuAc <sub>2</sub> Hex <sub>3</sub> HexNAc <sub>1</sub>



**Figure 16:** Analyse des glycosphingolipides par MALDI-MS. Les glycosphingolipides (A) isolés des cellules VERO (B) GSL isolés de *T. gondii* cultivé dans VERO ont été analysés après per-méthylation. Les oligosaccharides libérés après traitement des GSL (C) de cellules VERO (D) de *T.gondii* cultivé dans VERO à l'endoceramidase ont été analysés après perméthylation.



**Figure 17:** Analyse des glycosphingolipides par spectrométrie de masse. (A) MALDI-MS des GSL ; analyse par ESI-MS/MS (B) fragmentation de l'ion parent à  $m/z = 1010$  ; (C) fragmentation de l'ion parent à  $m/z = 1120$ .

### 3. Conclusion

Notre étude établit pour la première fois la capacité de biosynthèse de structures N-glycanniques par *Toxoplasma gondii*. En effet, ce parasite est capable de synthétiser, indépendamment de la cellule-hôte, des N-glycannes biantennés de type  $\text{Glc}_{0-3}\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ . Cette observation est en accord avec les prédictions basées sur l'identification *in silico* de certains gènes impliqués dans la biosynthèse des N-glycannes ainsi qu'avec la preuve de la présence d'une copie fonctionnelles d'Alg 7, première glycosyltransférase impliquée dans le cycle des dolichols.

De façon surprenante, le parasite transfère également des N-glycannes de type oligomannosidique classique, similaires aux structures synthétisées par son hôte, uniquement lorsqu'il est cultivé dans les cellules VERO ou HFF. Les expériences effectuées dans les mutants de glycosylation CHO B3F7 ont prouvé que la présence de structures oligomannosidiques n'étaient pas le fait d'une complémentation par les glycosyltransférases de la cellule-hôte.

Aussi, une hypothèse consiste à imaginer que le parasite récupère de façon non spécifique des Dol-PP-OS, précurseur des N-glycannes, de la cellule-hôte. Ces composés seraient ensuite transférés sur les protéines nouvellement synthétisées par l'oligosaccharyltransférase, dont la partie catalytique, STT3p a été clonée en système hétérologue, démontrant sa fonctionnalité (Shams-Eldin *et al.*, 2005).

Une fois transférés, le devenir ainsi que le rôle de ces N-glycannes ne sont pas définis. Cependant, il semble que ces structures ne subissent qu'un élagage très limité en comparaison avec la dégradation rapide des précurseurs  $\text{Glc}_{1-3}\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ , à l'origine de la structure majoritaire  $\text{Man}_4\text{GlcNAc}_2$  ainsi que l'élaboration de nombreuses structures complexes dans les cellules B3F7 (Duvet *et al.*, 2000). Cette observation concorde d'ailleurs avec l'absence apparente de la plupart des protéines impliquées dans le contrôle-qualité des glycoprotéines, dont font partie les glucosidases réticulaires (Banerjee *et al.*, 2007).

Ce rapport constitue le premier exemple de récupération d'intermédiaires glycanniques par un parasite intracellulaire. En revanche, il a été établi que *T. gondii* importe puis métabolise des lipides synthétisés par l'hôte car sa multiplication au sein de l'hôte implique une telle consommation de lipides que la production *de novo* par le parasite est insuffisante (Coppens *et al.*, 2000; Charron and Sibley, 2002; Coppens and Joiner, 2001). Ces échanges seraient facilités par l'association de la membrane de la vacuole parasitophore avec le

réticulum endoplasmique, où se déroule l'étape princeps de la N-glycosylation, ainsi qu'avec la mitochondrie, siège de la biosynthèse des lipides.

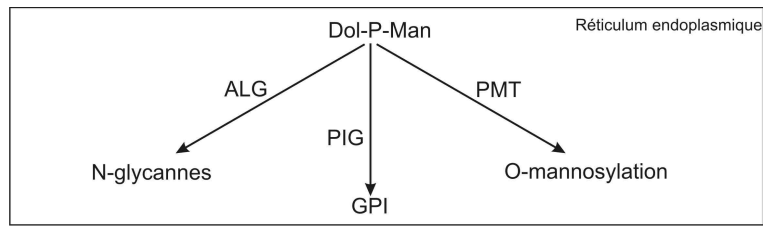
Nous avons par ailleurs initié une étude complémentaire visant la caractérisation d'éventuels glycosphingolipides à la surface de *T. gondii*. Les premiers résultats nous ont permis d'observer des profils complexes, comprenant des motifs sialylés, unusuels chez ce parasite. Ces observations ne seront validées que par l'observation *in vivo* de ces structures sialylées la surface du tachyzoïte.

## IV-Conclusion

Chez les microsporidies *E. cuniculi* et *A. locustae*, nous avons vérifié l'absence de N-glycannes. En revanche, nous avons caractérisé des structures O-glycanniques de type O-mannosyl, dont la voie de biosynthèse avait été mise en évidence suite au séquençage d'*E. cuniculi* (Samuelson *et al.*, 2005 ; Katinka *et al.*, 2002). Par ailleurs, une voie de biosynthèse d'ancres GPI a été mise en évidence, il serait évidemment intéressant de purifier et de caractériser les éventuels GPI synthétisé par ces microsporidies.

De la même façon, l'établissement des profils de glycosylation de *T. gondii*, nous a permis de démontrer pour la première fois sa capacité de biosynthèse de structure N-glycanniques biantennées  $\text{Glc}_{1-3}\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  indépendamment de l'hôte dans lequel il est cultivé. Ces résultats sont en accord avec les prédictions bioinformatiques. De plus, l'ensemble des résultats obtenus, incluant l'analyse des profils de N-glycosylation dans un mutant déficient en Dol-P-Man synthase, a établi que le parasite récupérait des intermédiaires de biosynthèse des N-glycannes de façon non spécifique puis les transférait sur ces protéines nouvellement synthétisées. Nous reportons ainsi le premier phénomène de récupération de composés glycolipidiques de l'hôte par un parasite intracellulaire. Les résultats préliminaires obtenus sur les glycosphingolipides, pourrait également indiquer un import de composés lipidiques. En effet, l'import et la métabolisation de céramides de l'hôte par *T. gondii* ont été précédemment reportés.

Finalement, chez les microsporidies, l'annotation du génome d'*E. cuniculi* indique, outre une voie de O-mannosylation, l'existence d'une potentielle voie de synthèse d'ancres GPI. Il est intéressant de constater que ces deux processus, tout comme la N-glycosylation, impliquent dans leurs premières étapes des glycosyltransférases utilisant le Dol-P-Man comme donneur. Il semblerait ainsi, que chez les parasites intracellulaires obligatoires que sont les microsporidies et *T. gondii*, l'utilisation du Dol-P-Man dans les processus de O-mannosylation ou de biosynthèse des GPI se fait au détriment de la N-glycosylation.



D'un point de vue évolutif, il est intéressant de constater chez *T. gondii* que l'absence d'activités Dol-P-Man mannosyltransférase impliquée dans la N-glycosylation semble être équilibrée par une synthèse accrue de glycoconjugués de type GPI (Wichroski et Ward, 2003). Puisqu'une origine génétique commune des Dol-P-Man transférases impliquées dans la N-glycosylation (ALG) et dans la biosynthèse des ancres GPI (PIG) a été suggérée (Oriol *et al.*, 2002), on peut imaginer que les mannosyltransférases de type ALG utilisant le Dol-P-Man comme donneur aurait rapidement évolué en enzymes de type PIG, favorisant exclusivement la synthèse des GPI chez *T. gondii*. La présence d'enzymes de type PIG chez les parasites du phylum des Apicomplexa concorde avec cette hypothèse (Delorenzi *et al.*, 2002). Cette hypothèse est renforcée par les travaux de Samuelson et collaborateurs, puisque de la comparaison des répertoires d'enzymes de type Alg chez différents organismes allant des protozoaires aux mammifères, ressort finalement la conception d'une évolution régressive à partir d'ancêtres communs possédant toutes les enzymes de type ALG.

Ainsi, nous pouvons imaginer que l'opportunité qu'avait le parasite d'utiliser des précurseurs N-glycanniques pour sa propre biosynthèse a levé la pression de sélection nécessaire à la conservation d'un cycle des dolichols intègre. Cette possibilité de récupération d'intermédiaires aurait constitué un "moteur" pour l'évolution spécifique de la machinerie de glycosylation chez ce parasite intracellulaire obligatoire.

# Conclusion générale

---



Les travaux présentés dans ce mémoire concernent l'étude de la variabilité structurale des glycoconjugués. Dans la première partie, nous nous sommes intéressés à la biodiversité des structures O-glycanniques de type mucine. Dans ce contexte, mes travaux ont démontré l'efficacité d'une nouvelle technique, simple et rapide, permettant de discriminer au sein d'un mélange d'O-glycannes neutres et acides des structures sulfatées. A l'avenir, l'utilisation de cette méthode devrait permettre d'aller plus loin dans l'étude de la biodiversité des structures O-glycanniques facilitant la mise en évidence des structures sulfatées, souvent difficiles à décrire lorsqu'elles sont étudiées en mélange.

L'analyse des structures des O-glycannes de type mucine portées par les glycoprotéines salivaires de la guêpe et du frelon a démontré que la O-glycosylation chez les insectes n'est pas limitée aux simples antigènes T et Tn, puisqu'elle a permis de caractériser pour la première fois des structures O-glycanniques complexes chez deux espèces d'insectes. De plus, si chez la guêpe la présence de O-glycannes chargés, substitués par de la phosphoéthanolamine avait été déterminée, il semble que chez le frelon, les groupements phosphoéthanolamine seraient portés uniquement par des structures N-glycanniques, impliquant une certaine spécificité d'espèce.

La seconde partie de mes travaux portés sur les capacités de N-glycosylation chez les parasites intracellulaires obligatoires. La description des potentiels de N-glycosylation de différents parasites a démontré que les prédictions issues des recherches *in silico* concernant les glycosyltransférases de type ALG étaient exactes. En effet, l'absence de N-glycosylation chez les deux microsporidies distantes *E. cuniculi* et *Antonospora locustae* concordent avec les prédictions issues des recherches bioinformatiques. Nous avons également confirmé l'existence d'une voie de O-mannosylation fonctionnelle en caractérisant de courtes chaînes similaires aux structures présentes sur les O-mannosylprotéines de *Candida albicans*. Finalement, l'annotation de gènes impliqués dans la biosynthèse des ancras GPI au sein du génome d'*E. cuniculi* ouvre une nouvelle voie d'exploration de la diversité des glycoconjugués chez cette microsporidie modèle.

Les études effectuées sur le second modèle, *Toxoplasma gondii*, ont vérifié l'absence des mannosyltransférases réticulaires utilisant le Dol-P-Man, se traduisant par la biosynthèse de N-glycannes tronqués, démontrant sans ambiguïté, pour la première fois, la capacité de N-glycosylation d'un membre du phylum des Apicomplexa.

Toutefois, la nature des N-glycannes synthétisés par ce parasite dans différents systèmes cellulaires, comprenant un mutant de N-glycosylation, nous a permis d'établir une origine mixte des N-glycannes synthétisés par cet organisme. En effet, si ce parasite est capable de synthétiser de façon autonome des N-glycannes tronqués, contenant du glucose, nous avons surtout démontré sa capacité de récupération de précurseurs de N-glycosylation provenant de l'hôte. Cet import permettrait au parasite de compléter son processus de N-glycosylation et de synthétiser des structures oligomannosidiques classiques. Des résultats préliminaires indiquent qu'un tel import pourrait également s'appliquer aux glycosphingolipides.

Enfin, d'un point de vue évolutif, il est intéressant de constater chez *T. gondii* qu'un défaut d'utilisation du Dol-P-Man dans le processus de N-glycosylation semble être équilibré par une synthèse accrue d'ancres GPI. La suggestion d'une origine génétique commune des Dol-P-Man transférases impliquées dans la N-glycosylation et dans la biosynthèse des ancres GPI permet d'imaginer que les mannosyltransférases de type ALG utilisant le Dol-P-Man comme donneur aurait rapidement évolué en enzymes de type PIG, favorisant exclusivement la synthèse des GPI chez *T. gondii*.

## Références

---

## REFERENCES

### A

---

Azzouz N, Rauscher B, Gerold P, Cesbron-Delauw MF, Dubremetz JF, Schwarz RT (2002) *Evidence for de novo sphingolipid biosynthesis in Toxoplasma gondii*, Int J Parasitol 32(6):677-84.

### B

---

Bacon JSD (1981) *Nature and disposition of polysaccharides within the cell envelope*, in *Yeast cell envelopes: biochemistry, biophysics and ultrastructure*, W.N. Arnold (Ed), CRC Press, vol.1, 65-84.

Banerjee S, Vishwanath P, Cui J, Kelleher DJ, Gilmore R, Robbins PW, Samuelson J (2007) *The evolution of N-glycan-dependent endoplasmic reticulum quality control factors for glycoprotein folding and degradation*, Proc Natl Acad Sci 104(28):11676-81.

Bigliardi E, Selmi MG, Lupetti P, Corona S, Gatti S, Scaglia M, Sacchi L (1996) *Microsporidian spore wall: ultrastructural findings on Encephalitozoon hellem exospore*, J Eukaryot Microbiol. 43(3):181-6.

Black MW, Boothroyd JC (2000) *Lytic cycle of Toxoplasma gondii*, Microbiol Mol Biol Rev 64(3):607-23. Review.

Boothroyd JC, Black M, Bonnefoy S, Hehl A, Knoll LJ, Manger ID, Ortega-Barria E, Tomavo S (1997) *Genetic and biochemical analysis of development in Toxoplasma gondii*, Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 352(1359):1347-54.

Brockhausen, I. (1995) *Biosynthesis of O-glycans of the N-acetylgalactosamine-a-Ser/Thr linkage type*, In *Glycoprotein*. J. Montreuil, H. Schachter and J.F.G. Vliegthart (Eds), Elsevier Science B.V., 201-259.

Brockhausen, I. (1999) *Pathways of O-glycan biosynthesis in cancer cells*, Biochim. Biophys. Acta 1473, 67-95.

Burger, D., Simon, M., Perruisseau, G., and Steck, A. J. (1990) *The epitope(s) recognized by HNK-1 antibody and IgM paraprotein in neuropathy is present on several N-linked oligosaccharide structures on human P0 and myelin-associated glycoprotein*. J. Neurochem. 54, 1569-1575.

- Capon C, Wieruszeski JM, Lemoine J, Byrd JC, Leffler H, Kim YS (1997) *Sulfated lewis X determinants as a major structural motif in glycans from LS174T-HM7 human colon carcinoma mucin*. J Biol Chem 19;272(51):31957-68.
- Capon C, Leroy Y, Wieruszeski JM, Ricart G, Strecker G, Montreuil J, Fournet B (1989) *Structures of O-glycosidically linked oligosaccharides isolated from human meconium glycoproteins* Eur. J. Biochem. 182, 139-152
- Carlsson HE, Sundblad G, Hammarstrom S, Lonngren J (1978) *Structure of some oligosaccharides derived from rat-intestinal glycoproteins*, Carbohydr. Res. 64, 181-188
- Carruthers VB (1999) *Armed and dangerous: Toxoplasma gondii uses an arsenal of secretory proteins to infect host cells*, Parasitol Int. 48(1):1-10. Review.
- Castro O, Movsichoff F, Parodi AJ (2006) *Preferential transfer of the complete glycan is determined by the oligosaccharyltransferase complex and not by the catalytic subunit*, Proc Natl Acad Sci U S A. 103(40):14756-60.
- Chaffin WL, Lopez-Ribot JL, Casanova M, Gozalbo D, Martinez JP (1998) *Cell wall and secreted proteins of Candida albicans: identification, function, and expression*, Microbiol Mol Biol Rev. 62(1):130-80. Review.
- Charron AJ, Sibley LD. (2002) *Host cells: mobilizable lipid resources for the intracellular parasite Toxoplasma gondii*, J Cell Sci. 115(Pt 15):3049-59.
- Cipollo JF, Awad AM, Costello CE, Hirschberg CB (2005) *N-Glycans of Caenorhabditis elegans are specific to developmental stages*, J Biol Chem., Jul 15;280(28):26063-72.
- Cipollo JF, Costello CE, Hirschberg CB. (2002) *The fine structure of Caenorhabditis elegans N-glycans*, J Biol Chem. 277(51):49143-57.
- Ciucanu I. and Kerek F. (1984) *A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates*, Carbohydr. Res., 131-209.
- Conzelmann A, Puoti A, Lester RL, Desponds C (1992) *Two different types of lipid moieties are present in glycosphosphoinositol-anchored membrane proteins of Saccharomyces cerevisiae*, EMBO J 11(2):457-66.
- Coppens Isabelle and Joiner A. Keith (2001) *Parasite-host cell interactions in toxoplasmosis: new avenues for intervention?*, Exp. Rev. Mol. Med. 15 January, <http://www.expertreviews.org/01002277h.htm>.
- Coppens I, Vielemeyer O. (2005) *Insights into unique physiological features of neutral lipids in Apicomplexa: from storage to potential mediation in parasite metabolic activities*, Int J Parasitol. 35(6):597-615. Review
- Coppens I. (2006) *Contribution of host lipids to Toxoplasma pathogenesis*, Cellular Microbiology 8 (1), 1-9.

Coppin A, Maes E, Morelle W, Strecker G (1999) *Structural analysis of 13 neutral oligosaccharide-alditols released by reductive beta-elimination from oviducal mucins of Rana temporaria*, Eur J Biochem 266(1):94-104.

Costello LC, Orlean P (1992) *Inositol acylation of a potential glycosyl phosphoinositol anchor precursor from yeast requires acyl coenzyme A*, J Biol Chem 267(12):8599-603.

---

## D

Davril M, Degroote S, Humbert P, Galabert C, Dumur V, Lafitte JJ, Lamblin G, Roussel P. (1999) *The sialylation of bronchial mucins secreted by patients suffering from cystic fibrosis or from chronic bronchitis is related to the severity of airway infectio.*, Glycobiology 9(3):311-21.

de Melo EJ, de Carvalho TU, de Souza W. (1992) *Penetration of T. gondii into host cells induces changes in the distribution of the mitochondria and the endoplasmic reticulum*, Cell Struct Funct. 17(5):311-7.

de Melo and de Souza, (1996) *Pathway of C6-NBD-ceramide on the host cell infected with Toxoplasma gondii*, Cell Struct. Funct. 21: 47–52.

Debierre-Grockiego F, Azzouz N, Schmidt J, Dubremetz JF, Geyer H, Geyer R, Weingart R, Schmidt RR, Schwarz RT (2003) *Roles of glycosylphosphatidylinositols of Toxoplasma gondii. Induction of tumor necrosis factor-alpha production in macrophages*, J Biol Chem 278(35):32987-93.

Dell A, Reason A, Khoo K, Panico M, McDowell R, Morris HR (1994) *Mass spectrometry of carbohydrate-containing biopolymers*, Methods Enzymol. 230, 108–132.

Dell A, Haslam SM, Morris HR, Khoo KH (1999) *Immunogenic glycoconjugates implicated in parasitic nematode diseases*, Biochim Biophys Acta ;1455(2-3):353-62. Review.

Desportes-Livage I (1996) *Human microsporidiosis and AIDS: recent advances*. Parasite 3(2):107-13. Review.

Dieckmann-Schuppert A, Bause E, Schwarz RT (1994) *Glycosylation reactions in Plasmodium falciparum, Toxoplasma gondii, and Trypanosoma brucei brucei probed by the use of synthetic peptides*, Biochim Biophys Acta. 1994 Jan 5;1199(1):37-44.

Dubremetz JF, Achbarou A, Bermudes D, Joiner KA (1993) *Kinetics and pattern of organelle exocytosis during Toxoplasma gondii/host-cell interactions*, Parasitol Res. 79(5):402-8.

Dubremetz JF (2007) *Rhoptries are major players in T. gondii invasion and host cell interaction*, Cell Microbiol. 9(4):841-8. Review.

Duvet S, Labiau O, Mir AM, Kmiecik D, Krag SS, Verbert A, Cacan R (1998) *Cytosolic deglycosylation process of newly synthesized glycoproteins generates*

*oligomannosides possessing one GlcNAc residue at the reducing end*, Biochem J. 335:389-96.

Duvet S, Chirat F, Mir AM, Verbert A, Dubuisson J, Cacan R. (2000) *Reciprocal relationship between alpha1,2 mannosidase processing and reglucosylation in the rough endoplasmic reticulum of Man-P-Dol deficient cells*, Eur J Biochem. 267:1146-52.

---

## E

Edesio JT, de Melo CT, de Souza W (1997) *Relationship between the Host Cell Endoplasmic Reticulum and the Parasitophorous Vacuole Containing T. gondii, Localization of Calreticulin, and Glucose-6-Phosphatase (luminal ER marker), On the PVM and in the intravacuolar space*, Cell Str. and function 22: 317-323.

Ellgaard L, Molinari M, Helenius A. (1999) *Setting the standards: quality control in the secretory pathway*, Science 286(5446):1882-8. Review.

Endo T, Pelster B, Piekarski G (1981) *Infection of murine peritoneal macrophages with T. gondii exposed to ultraviolet light*, Z Parasitenkd 65(2):121-9.

---

## F

Fiedler K, Simons K (1995) *The role of N-glycans in the secretory pathway*, Cell 81(3): 309-12.

Fiete, D., Snavstava, V., Hindsgaul, O., and Baenziger, J. U. (1991) *A hepatic reticuloendothelial cell receptor specific for S04-4GalNAc $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$  that mediates rapid clearance of lutropin*. Cell 67,1103-1110.

Florea D, Maes E, Strecker G (1997) *Primary structure of seven sulfated oligosaccharide-alditols released by reductive beta-elimination from oviducal mucins of Rana temporaria. Characterization of the sequence HSO3 (3) GlcA (beta1--3)Gal*, Carbohydr Res 302(3-4):179-89.

Fontaine MD, Wieruszkeski JM, Plancke Y, Delplace F, Strecker G (1995) *Structure of six 3-deoxy-D-glycero-D-galacto-nonulosonic acid(Kdn)-containing oligosaccharide-alditols released from oviduct secretions of Ambystoma maculatum. Characterization of the sequence fucosyl(alpha 1-2)[fucosyl(alpha 1-3)]fucosyl(alpha 1-4)-3-deoxy-D-glycero-D-galacto-nonulosonic acid*, Eur J Biochem 15;231(2):424-33.

Freeze HH, Aebi M. (2005) *Altered glycan structures: the molecular basis of congenital disorders of glycosylation*, Curr Opin Struct Biol. 15(5):490-8. Review.

---

## G

- Gao N, Lehrman MA. (2002) *Analyses of dolichol pyrophosphate-linked oligosaccharides in cell cultures and tissues by fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis*, *Glycobiology* 12(5):353-60.
- Gemmill TR, Trimble RB (1999) *Overview of N- and O-linked oligosaccharide structures found in various yeast species*, *Biochim Biophys Acta* 1426(2):227-37. Review.
- Gold DV and Shochat D (1989) *Studies on the structure of the organ-specific determinant of human colonic mucin*. *Mol. Immunol.* 26, 769-77.
- Groux-Degroote S, Krzewinski-Recchi MA, Cazet A, Vincent A, Lehoux S, Lafitte JJ, van Seuning I, Delannoy P (2007) *IL-6 and IL-8 increase the expression of glycosyltransferases and sulfotransferases involved in the biosynthesis of sialylated and/or sulfated Lewis x epitopes in the human bronchial mucosa*, *Biochem J.* 2007 Oct 18.
- Guerardel Y, Kol O, Maes E, Lefebvre T, Boilly B, Davril M, Strecker G (2000) *O-glycan variability of egg-jelly mucins from Xenopus laevis: characterization of four phenotypes that differ by the terminal glycosylation of their mucins*, *Biochem J.* 352 Pt 2:449-63.
- Guerardel Y, Balanzino L, Maes E, Leroy Y, Coddeville B, Oriol R, Strecker G (2001) *The nematode Caenorhabditis elegans synthesizes unusual O-linked glycans: identification of glucose-substituted mucin-type O-glycans and short chondroitin-like oligosaccharides*, *Biochem J.* 357(Pt 1):167-82.
- Guerardel Y, Petit D, Madigou T, Guillet B, Maes E, Maftah A, Boujard D, Strecker G, Kol O. (2003) *Identification of the blood group Lewis(a) determinant in the oviducal mucins of Xenopus tropicalis*. *FEBS Lett.* 554(3):330-6.
- Guerardel Y, Chang LY, Maes E, Huang CJ, Khoo KH (2006) *Glycomic survey mapping of zebrafish identifies unique sialylation pattern*, *Glycobiology* 16(3):244-57.
- Guha-Niyogi A, Sullivan DR, Turco SJ (2001) *Glycoconjugate structures of parasitic protozoa*, *Glycobiology* 11(4):45R-59R. Review.

## H

- 
- Hakomori S (1983) *Chemistry of glycosphingolipids*, In: *Handbook of lipid research* (Editor D.J. Hanahan), Plenum Press, Vol. 3 :1-165.
- Hammond C, Helenius A (1995) *Quality control in the secretory pathway*, *Curr Opin Cell Biol* 7(4): 523-9.
- Handman E, Goding JW, Remington JS (1980) *Detection and characterization of membrane antigens of T. gondii*, *J Immunol.* 124(6):2578-83.
- Hanisch FG, Chai W, Rosankiewicz JR, Lawson AM, Stoll MS, Feizi T (1993) *Core-typing of O-linked glycans from human gastric mucins. Lack of evidence for the occurrence of the core sequence Gal1-6GalNAc*, *Eur. J. Biochem.* 217, 645-655.



- Hard, K., Van Zadelhoff, C., Moonen, P., Kamerling, J. P., and Vliegthart, J. F. C. (1992) *The Asn-linked carbohydrate chains of human Tamm-Horsfahl glycoprotein of one male-novel sulfated and novel N-acetylgalactosamine containing N-linked carbohydrate chains.* Eur. J. Biochem. 209,895-915.
- Hard K, Van Doorn JM, Thomas-Oates JE, Kamerling JP, Van Der Horst DJ (1993) *Structure of the Asn-linked oligosaccharides of apolipoprotein III from the insect Locusta migratoria. Carbohydrate-linked 2-Aminoethylphosphonate as a constituent of a glycoprotein.* Biochemistry 32: 766-775.
- Hase S. (1994) *High-performance liquid chromatography of pyridylaminated saccharides,* Meth. Enzymol 230: 225-37.
- Hauri H, Appenzeller C, Kuhn F, Nufer O (2000) *Lectins and traffic in the secretory pathway,* FEBS Lett 476(1-2):32-7. Review Hauri 2000 première page N§g
- Hayman JR, Hayes SF, Amon J, Nash T.E. (2001) *Developmental expression of two spore wall proteins during maturation of the microsporidian Encephalitozoon intestinalis,* Infect Immun, 69, 7057-7066.
- Helenius A, Aebi M (2004) *Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum,* Annu Rev Biochem. 73:1019-49. Review.
- Helenius A, Aebi M (2001) *Intracellular functions of N-linked glycans,* Science 291, 2364-2369.
- Helling F, Dennis RD, Weske B, Nores G, Peter-Katalinic J, Dabrowski U, Egge H, Wiegandt H (1991) *Glycosphingolipids in insects. The amphoteric moiety, N-acetylglucosamine-linked phosphoethanolamine, distinguishes a group of ceramide oligosaccharides from the pupae of Calliphora vicina (Insecta: Diptera),* Eur J Biochem 200(2):409-21.
- Hemmerich S, Leffler H, Rosen SD. (1995) *Structure of the O-glycans in GlyCAM-1, an endothelial-derived ligand for L-selectin.* J Biol Chem.;270:12035-47.
- Hooper, L. V., Beranek, M. C., Manzella, S. M., and Baenziger, J. U. (1995) *Differential expression of GaINAc-4-sulfotransferase and GaINAc-transferase results in distinct glycoforms of carbonic anhydrase VI in parotid and submaxillary glands.* J. Biol. Chem. 270, 5985-5993.
- Hounsell EF, Feizi T (1982) *Gastrointestinal mucins. Structures and antigenicities of their carbohydrate chains in health and disease.* Med. Biol. 60, 227-236
- Hounsell EF, Lawson AM, Feeney J, Gooi HC, Pickering NJ, Stoll MS, Lui SC, Feizi T (1985) *Structural analysis of the O-glycosidically linked core-region oligosaccharides of human meconium glycoproteins which express oncofoetal antigens.* Eur. J. Biochem. 148, 367-377.

Huang HH, Tsai PL, Khoo KH (2001) *Selective expression of different fucosylated epitopes on two distinct sets of Schistosoma mansoni cercarial O-glycans: identification of a novel core type and Lewis X structure*, Glycobiology 11(5):395-406.

---

## I

Inoue S, Inoue Y (1997) *Fish glycoproteins*. In Glycoprotein II. J. Montreuil, J.F.G. Vliegthart and H. Schachter (Eds), Elsevier Science B.V., 143-161.

Inoue S, Lin SL, Inoue Y (2000) *Chemical analysis of the developmental pattern of polysialylation in chicken brain. Expression of only an extended form of polysialyl chains during embryogenesis and the presence of disialyl residues in both embryonic and adult chicken brains*, J Biol Chem. 275(39):29968-79.

Iwasaki M, Inoue S, Troy FA (1990) *A new sialic acid analogue, 9-O-acetyl-deaminated neuraminic acid, and alpha -2,8-linked O-acetylated poly(N-glycolylneuraminyl) chains in a novel polysialoglycoprotein from salmon eggs*, J Biol Chem 265(5):2596-602.

---

## J

Johnson AM, McDonald PJ, Neoh SH (1981) *Molecular weight analysis of the major polypeptides and glycopeptides of T. gondii*, Biochem Biophys Res Commun 100(3): 934-43.

Jones C, Todeschini AR, Agrellos OA, Previato JO, Mendonca-Previato L. (2004) *Heterogeneity in the biosynthesis of mucin O-glycans from Trypanosoma cruzi tulahuen strain with the expression of novel galactofuranosyl-containing oligosaccharides*, Biochemistry 43(37):11889-97.

Jones JL, Lopez A, Wilson M, Schulkin J, Gibbs R (2001) *Congenital toxoplasmosis: a review*, Obstet Gynecol Surv 56(5): 296-305.

Julien S, Adriaenssens E, Ottenberg K, Furlan A, Courtand G, Vercoutter-Edouart AS, Hanisch FG, Delannoy P, Le Bourhis X. (2006) *ST6GalNAc I expression in MDA-MB-231 breast cancer cells greatly modifies their O-glycosylation pattern and enhances their tumorigenicity*, Glycobiology 16(1):54-64.

---

## K

Karlsson NG, Karlsson H, Hansson GC. (1995) *Strategy for the investigation of O-linked oligosaccharides from mucins based on the separation into neutral, sialic acid- and sulfate-containing species*, Glycoconj J. 2(1), 69-76.

Katinka MD, Duprat S, Cornillot E, Metenier G, Thomarat F, Prensier G, Barbe V, Peyretailade E, Brottier P, Wincker P, Delbac F, El Alaoui H, Peyret P, Saurin W, Gouy M, Weissenbach J, Vivares CP. (2001) *Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite Encephalitozoon cuniculi*, Nature 414(6862):450-3.

- Keeley A, Soldati D (2004) *The glideosome: a molecular machine powering motility and host-cell invasion by Apicomplexa*, Trends Cell Biol. 14(10):528-32. Review.
- Keeling PJ (2003) *Congruent evidence from alpha-tubulin and beta-tubulin gene phylogenies for a zygomycete origin of microsporidie*, Fungal Genet Biol. 38(3):298-309.
- Kelleher DJ, Banerjee S, Cura AJ, Samuelson J, Gilmore R (2007) *Dolichol-linked oligosaccharide selection by the oligosaccharyltransferase in protist and fungal organisms*, J Cell Biol. 9; 177 (1):29-37.
- Kelleher DJ, Gilmore R (2006) *An evolving view of the eukaryotic oligosaccharyltransferase*, Glycobiology 16(4):47R-62R.
- Khoo K-H, Chatterjee D, Caulfield JP, Morris HR and Dell A (1997) *Structural mapping of the glycans from the egg glycoproteins of Schistosoma mansoni and Schistosoma japonicum: identification of novel core structures and terminal sequences* Glycobiology 7(5): 663-677.
- Khoo KH, Chatterjee D, Caulfield JP, Morris HR, Dell A (1997) *Structural mapping of the glycans from the egg glycoproteins of Schistosoma mansoni and Schistosoma japonicum: identification of novel core structures and terminal sequences*, Glycobiology 7(5):663-77.
- Khoo KH, Maizels RM, Page AP, Taylor GW, Rendell NB, Dell A. (1991) *Characterization of nematode glycoproteins: the major O-glycans of Toxocara excretory-secretory antigens are O-methylated trisaccharides*, Glycobiology 1(2):163-71.
- Khoo KH, Sarda S, Xu X, Caulfield JP, McNeil MR, Homans SW, Morris.HR, Dell A (1995) *A unique multifucosylated-3GalNAcBl-4GlcNAcBl-3Galal- motif constitutes the repeating unit of the complex O-glycans derived from the cercarial glycocalyx of Schistosoma mansoni*, J. Biol. Chem. 270, 17114-17123.
- Kim, J.H., Ogawa, K., and Wakabayashi, H. (1999) *Lectin-reactive components of the microsporidian Glugea plecoglossi and their relation to spore phagocytosis by head kidney macrophages of ayu Plecoglossus altivelis*, Dis Aquat Organ 39, 59-63.
- Klaren VN, Kijlstra A (2002) *Toxoplasmosis, an overview with emphasis on ocular involvement*, Ocul Immunol Inflamm 10(1): 1-26.
- Klein A, Diaz S, Ferreira I, Lamblin G, Roussel P, Manzi AE (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(3):421-32.
- Klein A, Lamblin G, Lhermitte M, Roussel P, Breg J, van Halbeek H, Vliegthart JFG (1988) *Primary structure of neutral oligosaccharides derived from respiratory-mucus glycoproteins of a patient suffering from bronchiectasis, determined by comparison of 500-MHz <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy and quantitative sugar analysis*, Eur. J. Biochem. 171, 631-642
- Knauer R, Lehle L. (1999) *The oligosaccharyltransferase complex from yeast*, Biochim

Biophys Acta. 1426(2):259-73.

Koles K, Irvine KD, Panin VM (2004) *Functional characterization of Drosophila sialyltransferase*, J Biol Chem 279, 4346-57

Koles K, Lim JM, Aoki K, Porterfield M, Tiemeyer M, Wells L, Panin V (2007) *Identification of N-glycosylated proteins from the central nervous system of Drosophila melanogaster*, Glycobiology. 2007 Sep 23.

Kopitz J (1997) *Glycolipids: structure and function*, In: H.J. Gabius and S. Gabius, Editors, Glycosciences, Chapman & Hall, Weinheim, 163–190.

Kornfeld R, Kornfeld S (1985) *Assembly of asparagine-linked oligosaccharides*, Annu Rev Biochem 54: 631-64.

Kramerov AA, Arbatsky NP, Rozovsky YM, Mikhaleva EA, Polesskaya OO, Gvozdev VA, Shibaev VN (1996) *Mucin-type glycoprotein from Drosophila melanogaster embryonic cells: characterization of carbohydrate component*, FEBS Lett. 378(3):213-8.

Kravetz JD, Federman DG. (2005) *Toxoplasmosis in pregnancy*, Am J Med. 118(3):212-6. Review.

Kubelka V, Altmann F, Staudacher E, Tretter V, Marz L, Hard K, Kamerling JP, Vliegenthart JFG (1993) *Primary structure of the N-linked carbohydrate chains from honeybee venom phospholipase A2*, Eur. J. Biochem. 213: 1193-1204.

Kubelka V, Altmann F, Kornfeld G, Marz L (1994) *Structures of the N-linked oligosaccharides of the membrane glycoproteins from three lepidopteran cell lines (Sf-21, IZD-Mb-0503, Bm-N)*, Arch Biochem Biophys 308(1):148-57.

---

## L

Lamblin G, Rahmoune H, Wieruszkeski JM, Lhermitte M, Strecker G, Roussel P (1991) *Structure of two sulphated oligosaccharides from respiratory mucins of a patient suffering from cystic fibrosis. A fast-atom-bombardment m.s. and 1H-n.m.r. spectroscopic study*, Biochem J. 275 (Pt 1):199-206.

Lamblin G, Lhermitte M, Klein A, Houdret N, Scharfman A, Ramphal R, Roussel P (1991) *The carbohydrate diversity of human respiratory mucins: a protection of the underlying mucosa?* Am. Rev. Respir. Dis. 144, S19-S24.

- Lamblin G, Degroote S, Perini J-M, Delmotte P, Scharfman A, Davril M, Lo-Guidice J-M, Houdret N, Dumur V, Klein A, Roussel P (2001) *Human airway mucin glycosylation: A combinatorial of carbohydrate determinants which vary in Cystic Fibrosis*, *Glycoconjugate J* 18: 661–84.
- Lehle, L., Eiden A., Lehnert K., Haselbeck A. and Kopetzki E. (1995) *Glycoprotein biosynthesis in Saccharomyces cerevisiae: ngd29, an N-glycosylation mutant allelic to och1 having a defect in the initiation of outer chain formation*, *FEBS Lett* 370(1-2): 41-5.
- Lekutis C, Ferguson D.J, Grigg M.E, Camps M and Boothroyd JC (2001) *Surface antigens of Toxoplasma gondii: variations on a theme*, *Int. J. Parasitol.* 31: 1285–1292.
- Lerouge P, Cabanes-Macheteau M, Rayon C, Fischette-Laine AC, Gomord V, Faye L (1998) *N-glycoprotein biosynthesis in plants: recent developments and future trends*, *Plant Mol Biol.*, Sep;38(1-2):31-48. Review.
- Leverly SB (2005) *Glycosphingolipid structural analysis and glycosphingolipidomics*, *Methods Enzymol.* 2005;405:300-69. Review.
- Lipke PN, Ovalle R (1988) *Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges*, *J Bacteriol.* 180(15):3735-40. Review.
- Lo-Guidice JM, Wieruszkeski JM, Lemoine J, Verbert A, Roussel P, Lamblin G (1994) *Sialylation and sulfation of the carbohydrate chains in respiratory mucins from a patient with cystic fibrosis*, *J Biol Chem* 269(29):18794-813.
- Lomer CJ, Bateman RP, Johnson DL, Langewald J, Thomas M (2001) *Biological control of locusts and grasshoppers*, *Annu Rev Entomol.* 46:667-702. Review.
- Lopez M, Gazon M, Juliant S, Plancke Y, Leroy Y, Strecker G, Cartron JP, Bailly P, Cerutti M, Verbert A, Delannoy P (1998) *Characterization of a UDP-Gal:Galbeta1-3GalNAc alpha 1,4-galactosyltransferase activity in a Mamestra brassicae cell line*, *J Biol Chem.* 273(50):33644-51.
- Lopez M, Tetaert D, Juliant S, Gazon M, Cerutti M, Verbert A, Delannoy P (1999) *O-glycosylation potential of lepidopteran insect cell lines*, *Biochim Biophys Acta.* 1427(1):49-61.
- Luft BJ, Remington JS (1982) *Effect of pregnancy on resistance to Listeria monocytogenes and T. gondii infections in mice*, *Infect Immun* 38(3): 1164-71.
- Luft, BJ, Naot Y, Araujo FG, Stinson EB, Remington JS (1983) *Primary and reactivated toxoplasma infection in patients with cardiac transplants. Clinical spectrum and problems in diagnosis in a defined population*, *Ann Intern Med* 99(1): 27-31.
- Luft BJ, Remington JS (1992) *Toxoplasmic encephalitis in AIDS*, *Clin Infect Dis.* Aug;15(2):211-22

- Maes E, Wieruszeski JM, Plancke Y, Strecker G (1995) *Structure of three Kdn-containing oligosaccharide-alditols released from oviducal secretions of Ambystoma tigrinum: characterization of the carbohydrate sequence Fuc (alpha 1-5) [Fuc (alpha 1-4)] Kdn (alpha 2-3/6)*, FEBS Lett. 23;358(2):205-10.
- Maes E, Plancke Y, Deplace F, Strecker G (1995) *Primary structure of acidic oligosaccharide-alditols derived from the jelly coat of Ambystoma tigrinum. Occurrence of oligosaccharides with fucosyl(alpha 1-5)[fucosyl(alpha 1-4)]-3-deoxy-D-glycero-D-galacto- nonulosonic acid and fucosyl (alpha 1-2) galactosyl (alpha 1-3)-N-acetylgalactosamine sequences*, Eur J Biochem 15;230(1):146-56.
- Maes E, Florea D, Delplace F, Lemoine J, Plancke Y, Strecker G (1997) *Structural analysis of the oligosaccharide-alditols released by reductive beta-elimination from oviducal mucins of Rana temporaria*, Glycoconj J. 14(1):127-46.
- Maes E, Florea D, Coppin A, Strecker G (1999) *Structural analysis of 20 oligosaccharide-alditols released from the jelly coat of Rana palustris eggs by reductive beta-elimination characterization of the polymerized sequence [Gal( $\beta$ 1,3)GalNAc( $\alpha$ 1,4)]*, Eur J Biochem 264(2):301-13.
- Maes E, Garenaux E, Strecker G, Leroy Y, Wieruszeski JM, Brassart C, Guerardel Y (2005) *Major O-glycans from the nest of Vespula germanica contain phospho-ethanolamine*, Carbohydrate research 340: 1852-1858.
- Marechal E, Azzouz N, de Macedo CS, Block MA, Feagin JE, Schwarz RT, Joyard J (2002) *Synthesis of chloroplast galactolipids in apicomplexan parasites*, Eukaryot Cell 1(4):653-6.
- Martensson S, Levery SB, Fang TT, Bendiak B (1998) *Neutral core oligosaccharides of bovine submaxillary mucin--use of lead tetraacetate in the cold for establishing branch positions*, Eur J Biochem 258(2):603-22.
- Mauras G, Dodeur M, Laget P, Senet JM, Bourrillon R (1980) *Partial resolution of the sugar content of T. gondii membrane*, Biochem Biophys Res Commun 97(3): 906-12.
- Meikle P, Richards GN, Yellowlees D (1987) *Structural determination of the oligosaccharide side chains from a glycoprotein isolated from the mucus of the coral Acropora Formosa*, J Biol Chem 262(35):16941-7.
- Melo NS, Nimtz M, Conradt HS, Fevereiro PS, Costa J (1997) *Identification of the human Lewis(a) carbohydrate motif in a secretory peroxidase from a plant cell suspension culture (Vaccinium myrtillus L.)*, FEBS Lett. 415(2):186-91.
- Mordue DG, Hakansson S, Niesman I, Sibley LD (1997) *Toxoplasma gondii resides in a vacuole that avoids fusion with host cell endocytic and exocytic vesicular trafficking pathways*, Exp. Parasitol. 92: 87-99.

Morelle W, Cabada MO, Strecker G (1998) *Structural analysis of oligosaccharide-alditols released by reductive beta-elimination from the jelly coats of the anuran Bufo arenarum*, Eur J Biochem 252(2):253-60.

Muchmore EA, Varki NM, Fukuda M, Varki A (1987) *Developmental regulation of sialic acid modifications in rat and human colon*, FASEB J. 1, 229-235.

Mutsaers JH, van Halbeek H, Vliegthart JF, Wu AM, Kabat EA (1986) *Typing of core and backbone domains of mucin-type oligosaccharides from human ovarian-cyst glycoproteins by 500-MHz 1H-NMR spectroscopy*. Eur. J. Biochem. 157, 139-146.

---

## N

Neuen-Jacob E, Figge C, Arendt G, Wendtland B, Jacob B, Wechsler W (1993) *Neuropathological studies in the brains of AIDS patients with opportunistic diseases*, Int J Legal Med 105(6): 339-50.

North SJ, Koles K, Hembd C, Morris HR, Dell A, Panin VM, Haslam SM (2006) *Glycomic studies of Drosophila melanogaster embryos*, Glycoconj J. 23(5-6):345-54.

---

## O

Odenthal-Schnittler M, Tomavo S, Becker D, Dubremetz JF and Schwarz RT (1993) *Evidence for N-linked glycosylation in T. gondii*, Biochem J. 291 ( Pt 3): 713-21.

Oriol R, Martinez-Duncker I, Chantret I, Mollicone R, Codogno P (2002) *Common origin and evolution of glycosyltransferases using Dol-P-monosaccharides as donor substrate*, Mol Biol Evol. 19(9):1451-63.

Orlean P (1990) *Dolichol phosphate mannanose synthase is required in vivo for glycosyl phosphatidylinositol membrane anchoring, O mannosylation, and N glycosylation of protein in Saccharomyces cerevisiae*, Mol Cell Biol 10(11):5796-805.

Orlean, P (1997) *Biogenesis of yeast wall and surface components*, p. 229–362. In J. Pringle, J. Broach, and E. Jones (ed.), Molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces, Vol. 3. Cell cycle and cell biology. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

---

## P

Parente JP, Wieruszkeski JM, Strecker G, Montreuil J, Fournet B, van Halbeek H, Dorland L, Vliegthart JF (1982) *A novel type of carbohydrate structure present in hen ovomucoid*, J Biol Chem 257(22):13173-6.

Parodi AJ (1993) *N-glycosylation in trypanosomatid protozoa*, Glycobiology 3(3):193-9. Review.

Parodi A.J (2000) *Protein glucosylation and its role in protein folding*, Annu Rev Biochem 69: 69-93.

Paz-Parente J, Strecker G, Leroy Y, Montreuil J, Fournet B, van Halbeek H, Dorland L, Vliegthart JF (1983) *Primary structure of a novel N-glycosidic carbohydrate unit, derived from hen ovomucoid. A 500-MHz 1H-NMR study*, FEBS Lett. 152(2):145-52.

Previato JO, Jones C, Goncalves LP, Wait R, Travassos LR, Mendonca-Previato L (1994) *O-glycosidically linked N-acetylglucosamine-bound oligosaccharides from glycoproteins of Trypanosoma cruzii*, Biochem J. 301 ( Pt 1):151-9.

---

## R

Rendic D, Klaudiny J, Stemmer U, Schmidt J, Paschinger K, Wilson IB (2007) *Towards abolition of immunogenic structures in insect cells: characterization of a honey-bee (Apis mellifera) multi-gene family reveals both an allergy-related core alpha1,3-fucosyltransferase and the first insect Lewis-histo-blood-group-related antigen-synthesizing enzyme*, Biochem J. 402(1):105-15.

Robbe C, Capon C, Coddeville B, Michalski JC (2004) *Structural diversity and specific distribution of O-glycans in normal human mucins along the intestinal tract*, Biochem J. 384(Pt 2):307-16.

Robbe C, Capon C, Maes E, Rousset M, Zweibaum A, Zanetta JP, Michalski JC. (2003) *Evidence of regio-specific glycosylation in human intestinal mucins: presence of an acidic gradient along the intestinal tract*. J Biol Chem.278: 46337-48.

Roth J, Kempf A, Reuter G, Schauer R, Gehring WJ (1992) *Occurrence of sialic acids in Drosophila melanogaster*, Science 256(5057):673-5.

Roussel P, Lamblin G (1996) *Human mucosal mucins in diseases*. In Glycoproteins and Diseases. Neuberger, A. & Van Deenen, L.L.M. Elsevier Science B.V., 351-394.

---

## S

Samuelson J, Banerjee S, Magnelli P, Cui J, Kelleher DJ, Gilmore R, Robbins PW (2005) *The diversity of dolichol-linked precursors to AsN-linked glycans likely results from secondary loss of sets of glycosyltransferases*, Proc Natl Acad Sci U S A, 102(5):1548-53.

Scharfman A, Arora SK, Delmotte P, Van Brussel E, Mazurier J, Ramphal R, Roussel P. (2001) *Recognition of Lewis x derivatives present on mucins by flagellar components of Pseudomonas aeruginosa*. Infect Immun. Sep;69(9):5243-8.

Scharfman A, Delmotte P, Beau J, Lamblin G, Roussel P, Mazurier J. (2000) *Sialyl-Le(x) and sulfo-sialyl-Le(x) determinants are receptors for P. aeruginosa*. Glycoconj J. 17, 735-40.

Savage AV, Donoghue CM, D'Arcy SM, Koeleman CA, van den Eijnden DH (1990) *Structure determination of five sialylated trisaccharides with core types 1, 3 or 5 isolated from bovine submaxillary mucin*, Eur. J. Biochem. 192, 427-432.



- Schachter H, Brockhausen I (1989) *The biosynthesis of branched O-glycans*, Symp Soc Exp Biol. 43:1-26. Review.
- Schwartzman JD, Pfefferkorn ER (1982), *T. gondii: purine synthesis and salvage in mutant host cells and parasites*, Exp Parasitol. 53(1):77-86.
- Schwarz M, Knauer R, Lehle L (2005) *Yeast oligosaccharyltransferase consists of two functionally distinct sub-complexes, specified by either the Ost3p or Ost6p subunit*, FEBS Lett. 579(29):6564-8.
- Schwarz, R.T. and Datema R. (1982) *The lipid pathway of protein glycosylation and its inhibitors: the biological significance of protein-bound carbohydrates*, Adv Carbohydr Chem Biochem 40: 287-379.
- Schwientek T, Bennett EP, Flores C, Thacker J, Hollmann M, Reis CA, Behrens J, Mandel U, Keck B, Schafer MA, Haselmann K, Zubarev R, Roepstorff P, Burchell JM, Taylor-Papadimitriou J, Hollingsworth MA, Clausen H (2002) *Functional conservation of subfamilies of putative UDP-N-acetylgalactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases in Drosophila, Caenorhabditis elegans, and mammals. One subfamily composed of l(2)35Aa is essential in Drosophila*, J Biol Chem. 277(25):22623-38.
- Seppo A, Moreland M, Schweingruber H, Tiemeyer M (2000) *Zwitterionic and acidic glycosphingolipids of the Drosophila melanogaster embryo*, Eur J Biochem 267(12):3549-58.
- Seppo A, Tiemeyer M (2000) *Function and structure of Drosophila glycans*, Glycobiology 10(8):751-60. Review
- Shams-Eldin H, Blaschke T, Anhlan D, Niehus S, Muller J, Azzouz N, Schwarz RT (2005) *High-level expression of the T. gondii STT3 gene is required for suppression of the yeast STT3 gene mutation*, Mol Biochem Parasitol. 143(1):6-11.
- Sharma SD, Mullenax J, Araujo FG, Erlich HA, Remington JS (1983) *Western Blot analysis of the antigens of T. gondii recognized by human IgM and IgG antibodies*, J. Immunol 131(2): 977-83.
- Sibley LD, 2003, *T. gondii: perfecting an intracellular life style*, Traffic 4(9):581-6. Review.
- Sinai AP, Webster P, Joiner KA. (1997) *Association of host cell endoplasmic reticulum and mitochondria with the T. gondii parasitophorous vacuole membrane: a high affinity interaction*, J Cell Sci. 110 (Pt 17):2117-28.
- Sonda S, Sala G, Ghidoni R, Hemphill A, Pieters J (2005) *Inhibitory effect of aureobasidin A on Toxoplasma gondii*, Antimicrob Agents Chemother. 49(5):1794-801.
- Spik G, Coddeville B, Montreuil J (1988) *Comparative study of the primary structures of sero-, lacto- and ovotransferrin glycans from different species*, Biochimie 70(11):1459-69.

- Spiro, R. G., and Bhoyroo, V. D. (1988) *Occurrence of sulfate in the asparagine-linked complex carbohydrate units of thyroglobulin-identification and localization of galactose-3-sulfate and N-acetylglucosamine-6-sulfate residues in the human and calf proteins*. J. Biol. Chem. 263, 14351-14358.
- Springer GF (1997) *Immunoreactive T and Tn epitopes in cancer diagnosis, prognosis, and immunotherapy*, J Mol Med. 75(8):594-602. Review.
- Staudacher E, Altmann F, Marz L, Hard K, Kamerling P, Vliegthart JFG (1992) *K1-6(K1-3)-Difucosylation of the asparagine-bound N-acetylglucosamine in honeybee venom phospholipase A2*, Glycoconj. J. 9 82-85.
- Strahl-Bolsinger S, Gentsch M, Tanner W (1999) *Protein O-mannosylation*, Biochim Biophys Acta. 426(2):297-307. Review.
- Strecker G, Wieruszski JM, Martel C, Montreuil J (1989) *Complete <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-n.m.r. assignments for two sulphated oligosaccharide alditols of hen ovomucine*, Carbohydr Res 185(1):1-13.
- Strecker G, Wieruszski JM, Cuvillier O, Michalski JC, Montreuil J (1992) *<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C-NMR assignments for sialylated oligosaccharide-alditols related to mucins. Study of thirteen components from hen ovomucin and swallow nest mucin*, Biochimie 74(1):39-51.
- Strecker G, Wieruszski JM, Michalski JC, Montreuil J. (1992) *<sup>1</sup>H-and <sup>13</sup>C-n.m.r. spectroscopy of 2-oxo-3-deoxy-D-glycero-D- galactononulosonic acid-containing oligosaccharide-alditols bearing Lewis X, Lewis Y and A-Lewis Y determinants isolated from the jelly coat of Pleurodeles waltl eggs*. Biochem J. 287, 905-909.
- Strecker G, Wieruszski JM, Michalski JC, Alonso C, Boilly B, Montreuil J (1992) *Characterization of Lex, Ley and A Ley antigen determinants in Kdn-containing O-linked glycan chains from Pleurodeles waltl jelly coat eggs*. FEBS lett. 298, 39-43.
- Strecker G, Wieruszski JM, Plancke Y, Boilly B (1995) *Primary structure of 12 neutral oligosaccharide-alditols released from the jelly coats of the anuran Xenopus laevis by reductive  $\beta$ -elimination*. Glycobiology 5, 137-146.
- Striepen B, Zinecker CF, Damm JBL, Melgers PAT, Gewig G.J, Koolen M, Vliegthart J.F.G, Dubremetz JF and Schwarz RT (1997) *Molecular structure of the low molecular weight antigen' of Toxoplasma gondii: a glucose  $\alpha$ 1-4-N-acetylgalactosamine makes free glycosyl-phosphatidylinositols highly immunogenic*, J. Mol. Biol. 266 : 797-813.
- Stoll, J. (1986) *The isolation and characterization of mammalian glycoprotein mutants*. PhD Thesis. School of Hygiene and Public Health, The Johns Hopkins University, Baltimore, MD, USA.
- Stwora-Wojczyk MM, Dzierszinski F, Roos DS, Spitalnik SL, Wojczyk BS (2004) *Functional characterization of a novel Toxoplasma gondii glycosyltransferase: UDP-*

*N*-acetyl-*D*-galactosamine: polypeptide *N*-acetylgalactosaminyltransferase-T3, Arch Biochem Biophys. 426(2):231-40.

Stwora-Wojczyk MM, Kissinger JC, Spitalnik SL, Wojczyk BS (2004) *O*-glycosylation in *Toxoplasma gondii*: identification and analysis of a family of UDP-GalNAc:polypeptide *N*-acetylgalactosaminyltransferases, Int J Parasitol. 34(3):309-22.

Suzuki N, Khoo KH, Chen CM, Chen HC, Lee YC (2003) *N*-glycan structures of pigeon IgG: a major serum glycoprotein containing Gal $\alpha$ 1-4 Gal termini, J Biol Chem. 278(47):46293-306.

Suzuki N, Laskowski M Jr, Lee YC (2004) Phylogenetic expression of Gal $\alpha$ 1-4Gal on avian glycoproteins: glycan differentiation inscribed in the early history of modern birds, Proc Natl Acad Sci U S A. 101(24):9023-8.

---

## T

Takahashi N, Khoo KH, Suzuki N, Johnson JR, Lee YC (2001) *N*-glycan structures from the major glycoproteins of pigeon egg white: predominance of terminal Gal $\alpha$ 1Gal, J. Biol Chem.;276(26):23230-9.

Takahashi N, Masuda K, Hiraki K, Yoshihara K, Huang HH, Khoo KH, Kato K (2003) *N*-Glycan structures of squid rhodopsin, Eur J Biochem. 270(12):2627-32.

Taupin V, Garenaux E, Mazet M, Maes E, Denise H, Prensier G, Vivares CP, Guerardel Y, Metenier G. (2007) Major *O*-glycans in the spores of two microsporidian parasites are represented by unbranched manno-oligosaccharides containing  $\alpha$ -1,2 linkages, Glycobiology 17(1):56-67.

Teinturier-Lelievre M, Julien S, Juliant S, Guerardel Y, Duonor-Cerutti M, Delannoy P, Harduin-Lepers A (2005) Molecular cloning and expression of a human hST8Sia VI ( $\alpha$ 2,8-sialyltransferase) responsible for the synthesis of the diSia motif on *O*-glycosylproteins, Biochem J. 392(Pt 3):665-74.

Ten Hagen KG, Tran DT (2002) A UDP-GalNAc:polypeptide *N*-acetylgalactosaminyltransferase is essential for viability in *Drosophila melanogaster*, J Biol Chem. 277(25):22616-22.

Texier C, Brosseau D, El Alaoui H, Metenier G, Vivares CP (2005) Post-genomics of microsporidia, with emphasis on a model of minimal eukaryotic proteome: a review, Folia Parasitol 52(1-2):15-22. Review.

Thomarat F, Vivares CP, Gouy M (2004) Phylogenetic analysis of the complete genome sequence of *Encephalitozoon cuniculi* supports the fungal origin of microsporidia and reveals a high frequency of fast-evolving genes, J Mol Evol. 59(6):780-91.

Thomsen DR, Post LE, Elhammer AP (1990) Structure of *O*-glycosidically linked oligosaccharides synthesized by the insect cell line Sf9, J Cell Biochem 43(1):67-79.

Thomsson KA, Schulz BL, Packer NH, Karlsson NG. (2005) *MUC5B glycosylation in human saliva reflects blood group and secretor status*. *Glycobiology*. 15: 791-804.

Thornton DJ, Sheehan JK. (2004) *From mucins to mucus: toward a more coherent understanding of this essential barrier.*, *Proc Am Thorac Soc*.1(1):54-61. Review.

Todeschini AR, da Silveira EX, Jones C, Wait R, Previato JO, Mendonca-Previato L (2001) *Structure of O-glycosidically linked oligosaccharides from glycoproteins of Trypanosoma cruzi CL-Brener strain: evidence for the presence of O-linked sialyl-oligosaccharides*, *Glycobiology* 11(1):47-55.

---

## V

Van der Vaart JM, Caro LH, Chapman JW, Klis FM, Verrips CT (1995) *Identification of three mannoproteins in the cell wall of Saccharomyces cerevisiae*, *J Bacteriol*. 177(11):3104-10.

Van Halbeek H, Strang AM, Lhermitte M, Rahmoune H, Lamblin G, Roussel P (1994) *Structures of monosialyl oligosaccharides isolated from the respiratory mucins of a non-secretor (O, Lea+b-) patient suffering from chronic bronchitis. Characterization of a novel type of mucin carbohydrate core structure*, *Glycobiology* 4, 203-219.

Vavra J, Larson J (1999) *Structure of the microsporidia*. In *The Microsporidia and Microsporidiosis*, Wittner, M., and Weiss, L.M. (eds). Washington, DC: ASM Press, pp. 7-84.

Villemant C (2005) *Les nids de guêpes solitaires et sociales*, *Insectes* n° 136, 23-25.

Villers C, Cacan R, Mir AM, Labiau O, Verbert A (1994) *Release of oligomannoside-type glycans as a marker of the degradation of newly synthesized glycoproteins*, *Biochem J*.298 ( Pt 1):135-42.

Vivares CP, Gouy M, Thomarat F, Metenier G (2002) *Functional and evolutionary analysis of a eukaryotic parasitic genome*, *Curr Opin Microbiol*. 5(5):499-505. Review.

Vivares CP, Metenier G (2001) *The microsporidian Encephalitozoon*, *Bioessays* 23(2):194-202. Review.

---

## W

Weerapana E, Imperiali B (2006) *Asparagine-linked protein glycosylation: from eukaryotic to prokaryotic systems*, *Glycobiology* 16(6):91-101, Review.

Weiss LM (2001) *Microsporidia: emerging pathogenic protists*, *Acta Trop*. 78(2):89-102. Review.

Wheeler SF, Harvey DJ (2000) *Negative ion mass spectrometry of sialylated carbohydrates: discrimination of N-acetylneuraminic acid linkages by MALDI-TOF and ESI-TOF mass spectrometry*, *Anal Chem* 72(20):5027-39.

Wichroski MJ, Ward GE (2003) *Biosynthesis of glycosylphosphatidylinositol is essential to the survival of the protozoan parasite Toxoplasma gondii*, Eukaryot Cell 2(5):1132-6.

Wieruszeski JM, Michalski JC, Montreuil J, Strecker G, Peter-Katalinic J, Egge H, van Halbeek H, Mutsaers JH, Vliegenthart JF. (1987) *Structure of the monosialyl oligosaccharides derived from salivary gland mucin glycoproteins of the Chinese swiftlet (genus Collocalia). Characterization of novel types of extended core structure, Gal beta(1----3)[GlcNAc beta(1----6)] GalNAc alpha(1----3)GalNAc(-ol), and of chain termination, [Gal alpha(1----4)]0-1[Gal beta(1----4)]2GlcNAc beta(1----.)* J Biol Chem. 262(14):6650-7.

Wirth DF, Lodish HF, Robbins PW (1979) *Requirements for the insertion of the Sindbis envelope glycoproteins into the endoplasmic reticulum membrane*, J Cell Biol 81(1): 154-62.

---

## X

Xu Y, Takvorian PM, Cali A, Orr G, Weiss LM (2004) *Glycosylation of the major polar tube protein of Encephalitozoon hellem, a microsporidian parasite that infects humans*, Infect Immun, 72, 6341-6350

Xu Y, Weiss LM (2005) *The microsporidian polar tube: a highly specialised invasion organelle*, Int J Parasitol. 35(9):941-53. Review.

---

## Y

Yagodnik C, De la Canal L, Parodi AJ (1987) *Tetrahymena pyriformis cells are deficient in all mannose-P-dolichol-dependent mannosyltransferases but not in mannose-P-dolichol synthesis*, Biochemistry 26: 5937-5943.

Yamashita K, Kamerling JP, Kobata A (1982) *Structural study of the carbohydrate moiety of hen ovomucoid. Occurrence of a series of pentaantennary complex-type asparagine-linked sugar chains*, J Biol Chem. 10;257(21):12809-14.

Yamashita K, Tachibana Y, Hitoi A, Kobata A (1984) *Sialic acid-containing sugar chains of hen ovalbumin and ovomucoid*, Carbohydr Res. 130:271-88.

Yuen, C.-T., Lawson, A. M., Chai, W., Larkin, M., Stoll, M. S., Stuart, A. C., Sullivan, F. X., Ahem, I. I., and Feizi, I. (1992) *Novel sulfated ligands for the cell adhesion molecule E-selectin revealed by the neoglycolipid technology among O-linked oligosaccharides on an ovarian cystadenoma glycoprotein*. Biochemistry 31,9126-9131.

---

## Z

Zanetta, J.P., Timmerman, P., and Leroy, Y. (1999) *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, 9, 255–266.*

Zinecker CF, Striepen B, Geyer H, Geyer R, Dubremetz JF, Schwarz RT (2001) *Two glycoforms are present in the GPI-membrane anchor of the surface antigen 1 (P30) of T. gondii*, Mol Biochem Parasitol. 116(2):127-35.

Zufferey R, Knauer R, Burda P, Stagljar I, te Heesen S, Lehle L, Aebi M. (1995) *STT3, a highly conserved protein required for yeast oligosaccharyl transferase activity in vivo*, EMBO J. 14(20):4949-60.

Le terme glycosylation renvoie à des molécules très diverses : glycoprotéines, glycolipides ou polysaccharides. Chacune de ces formes présente une incroyable diversité structurale, variant selon les espèces considérées. Les travaux effectués au cours de ma thèse regroupent l'exploration des capacités de glycosylation de différents organismes eucaryotes.

Dans un premier temps, mes travaux ont consisté à étudier la O-glycosylation de type mucine. L'analyse des O-glycannes libérés des mucines salivaires de la guêpe *Vespula germanica* a permis d'isoler pour la première fois des structures O-glycanniques chargées, substituées par de la phosphoéthanolamine chez un insecte. En marge de ces structures majoritaires, des O-glycannes complexes, minoritaires, ont été identifiés. Chez le frelon *Vespa crabro*, aucun O-glycane chargé n'a été observé, mais une famille de composés neutres, différents de ceux décrits chez la guêpe, a pu être caractérisée. Par ailleurs, à partir de différentes sources biologiques contenant des O-glycannes sulfatés, nous avons mis au point et validé une méthode de purification rapide et spécifique qui à l'avenir permettra de caractériser plus simplement des structures sulfatées au sein d'un mélange complexe d'oligosaccharides.

La seconde partie de mes travaux porte sur la conservation de la N-glycosylation chez les parasites intracellulaires obligatoires à travers l'étude des microsporidies *Encephalitozoon cuniculi* et *Antonospora locustae* ainsi que de *Toxoplasma gondii*, représentant du phylum des Apicomplexa. Chez les microsporidies, nos études structurales ont permis de confirmer l'absence de N-glycosylation et l'existence d'une voie de O-mannosylation fonctionnelle, semblable à celle observée chez les levures, en accord avec les prédictions *in silico*. Enfin, chez *T. gondii*, nous avons établi que les structures N-glycanniques portées par les protéines parasitaires résultaient à la fois d'une voie de N-glycosylation propre au parasite et de la récupération d'intermédiaires de biosynthèse provenant de l'hôte. Ce phénomène original, jamais décrit auparavant, offre de nouvelles perspectives dans l'étude des interactions privilégiées existant entre hôte et parasite intracellulaire. Des études préliminaires indiquent par ailleurs que ce phénomène de récupération pourrait également s'appliquer aux glycosphingolipides.

---

This work compiles structural analyses of a variety of glycoconjugates (mucin-type O-glycans, O-mannose, N-glycans, and glycosphingolipids) exclusively isolated from eukaryotic organisms.

First part of my work concerned mucin-type O-glycans. First report describes O-glycans isolated from salivary mucins of two insects species. We characterized by NMR phosphoethanolamine containing O-glycans in wasp *Vespula germanica*. Along major compounds, mass spectrometry analysis revealed minor, heterogeneous neutral oligosaccharides. In hornet *Vespa crabro*, we characterized a homogeneous family of complex neutral oligosaccharides, differing from those described in wasp. Second work concerns the description of a method allowing isolation and characterization of sulfated O-glycans. Indeed, by studying a wide range of mucin type O-glycan mixture isolated from different biological sources, we demonstrate that our method permits without prior chemical modification to specifically purify sulphate containing oligosaccharides from very complex mixtures of molecules.

Second part was dedicated to N-glycosylation in intracellular obligate parasite: two microsporidians *Encephalitozoon cuniculi* and *Antonospora locustae* in addition to the apicomplexan *Toxoplasma gondii*. In microsporidians, structural analysis revealed absence of N-glycosylation and existence of a functional O-mannosylation pathway, accordingly to *in silico* predictions. Finally in *Toxoplasma gondii* we evidenced that glycoproteins N-glycans originated from a truncated parasite-independent N-glycosylation pathway, and from the scavenging of host biosynthesis intermediates. Preliminary results indicate that this scavenging could also concern glycosphingolipids.