



HAL
open science

**DÉVELOPEMENT D'UN SYSTÈME DE
RÉGÉNÉRATION D'UDP-GA1NAC POUR LA
GLYCOSYLATION ENZYMATIQUE
D'OLIGOSACCHARIDES ET DE PEPTIDES
D'INTÉRÊT THÉRAPEUTIQUE**

Vanessa Bourgeau

► **To cite this version:**

Vanessa Bourgeau. DÉVELOPEMENT D'UN SYSTÈME DE RÉGÉNÉRATION D'UDP-GA1NAC POUR LA GLYCOSYLATION ENZYMATIQUE D'OLIGOSACCHARIDES ET DE PEPTIDES D'INTÉRÊT THÉRAPEUTIQUE. domain_other. Université d'Orléans, 2006. Français. NNT : . tel-00160999

HAL Id: tel-00160999

<https://theses.hal.science/tel-00160999>

Submitted on 9 Jul 2007

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITE D'ORLEANS

**THESE PRESENTEE A L'UNIVERSITE D'ORLEANS
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE D'ORLEANS**

Discipline : Biochimie

PAR

Vanessa BOURGEAUX

Développement d'un système de régénération d'UDP-GalNAc pour la glycosylation enzymatique d'oligosaccharides et de peptides d'intérêt thérapeutique.

Soutenue le 15 décembre 2006

MEMBRES DU JURY

- | | |
|---|--------------------|
| - Mme Claudine AUGÉ, <i>Directeur de recherche au CNRS, Orsay</i> | Rapporteur |
| - M. Bernard BADET, <i>Directeur de recherche au CNRS, Gif-sur-Yvette</i> | Rapporteur |
| - Mme Sylvie BAY, <i>Chargée de recherche à l'Institut Pasteur, Paris</i> | Examineur |
| - M. Francis DELMOTTE, <i>Professeur à l'Université d'Orléans</i> | Président du Jury |
| - Mme Véronique PILLER, <i>Chargée de recherche au CNRS, Orléans</i> | Directeur de thèse |



UNIVERSITE D'ORLEANS

**THESE PRESENTEE A L'UNIVERSITE D'ORLEANS
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE D'ORLEANS**

Discipline : Biochimie

PAR

Vanessa BOURGEAUX

Développement d'un système de régénération d'UDP-GalNAc pour la glycosylation enzymatique d'oligosaccharides et de peptides d'intérêt thérapeutique.

Soutenue le 15 décembre 2006

MEMBRES DU JURY

- | | |
|---|--------------------|
| - Mme Claudine AUGÉ, <i>Directeur de recherche au CNRS, Orsay</i> | Rapporteur |
| - M. Bernard BADET, <i>Directeur de recherche au CNRS, Gif-sur-Yvette</i> | Rapporteur |
| - Mme Sylvie BAY, <i>Chargée de recherche à l'Institut Pasteur, Paris</i> | Examineur |
| - M. Francis DELMOTTE, <i>Professeur à l'Université d'Orléans</i> | Président du Jury |
| - Mme Véronique PILLER, <i>Chargée de recherche au CNRS, Orléans</i> | Directeur de thèse |

Remerciements

Ce travail a été réalisé au Centre de Biophysique Moléculaire du CNRS à Orléans, dirigé par M. Jean-Claude Beloeil que je remercie de m'avoir accueillie dans son laboratoire et de m'avoir permis d'y effectuer une thèse.

Je remercie vivement Mme Véronique Piller, mon directeur de thèse, et M. Friedrich Piller de m'avoir accueillie au sein de leur équipe, de m'avoir fait partager leur expertise scientifique et surtout d'avoir été aussi disponibles.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à Mme Claudine Augé et M. Bernard Badet pour avoir accepté d'examiner et de juger ce travail ainsi qu'à Mme Sylvie Bay et M. Francis Delmotte pour faire partie du jury de cette thèse.

Je remercie M. Olivier Martin de m'avoir accueillie dans ses locaux pour la synthèse de substrats modifiés ainsi que Sophie Front-Deschamps et Mathieu Laurent pour leur aide et leurs conseils précieux. Je remercie Mme Martine Cadène de m'avoir permis d'intégrer temporairement l'équipe de spectrométrie de masse pour la caractérisation des glycopeptides que j'ai produit ainsi que Corinne Buré et Rémy Puppo pour leur expertise technique et leur disponibilité pour les analyses. Mes remerciements vont également à l'équipe de Mme Françoise Vovelle et particulièrement à Céline Landon et Hervé Meudal qui ont accepté de se lancer dans le projet de STD-NMR.

Je tiens aussi à remercier les équipes d'Agnès Delmas, d'Ulysse Asseline et d'Annie-Claude Roche et particulièrement M. Monsigny qui m'a apporté une aide précieuse pour l'interprétation de mes spectres.

Je remercie très chaleureusement Sylvain Bourgerie et Nicole Bureau pour leur sympathie et leur soutien tout au long de ces trois années.

Je remercie toutes les personnes du CBM qui ont contribué à rendre ce travail de thèse très agréable. Merci également à mes parents et mon frère de m'avoir toujours soutenue dans mes choix.

Je remercie enfin la Région Centre et le CNRS d'avoir accepté de financer ce travail par une bourse de docteur ingénieur.

PRINCIPALES ABRÉVIATIONS	8
INTRODUCTION	11
GÉNÉRALITÉS	13
I. LE PROCESSUS DE GLYCOSYLATION	15
I.1. Les différentes structures glycaniques	15
<i>I.1.1. Les glycoprotéines</i>	<i>16</i>
<i>I.1.2. Les glycolipides</i>	<i>20</i>
I.2. Biosynthèse des glycoconjugués	21
<i>I.2.1. Un processus ordonné et séquentiel</i>	<i>21</i>
<i>I.2.2. L'initiation de la glycosylation des protéines de type mucine</i>	<i>23</i>
<i>I.2.3. Biosynthèse des antigènes du groupe sanguin A</i>	<i>26</i>
I.3. Rôle des glycoconjugués in vivo	27
<i>I.3.1. Rôle de modulateurs chimiques et physico-chimiques</i>	<i>28</i>
<i>I.3.2. Facteurs de transport et d'adressage</i>	<i>28</i>
<i>I.3.3. Processus biologiques</i>	<i>29</i>
<i>I.3.4. Structures glycaniques et maladies</i>	<i>30</i>
II. DE L'ÉTUDE FONCTIONNELLE DES GLYCANES AUX APPLICATIONS THÉRAPEUTIQUES	32
III. LA O-GLYCOSYLATION : UN DOMAINE À EXPLORER	36
III.1. Recherche d'un inhibiteur	36
III.2. Recherche d'un donneur	41
III.3. Utilisation de glycopeptides synthétiques	43
IV. SYNTHÈSE DE MIMES GLYCANIQUES	44
IV.1. Synthèse par voie chimique	44
<i>IV.1.1. Synthèse des polysaccharides</i>	<i>44</i>
<i>IV.1.2. Synthèse des glycopeptides</i>	<i>46</i>
<i>IV.1.3. Synthèse de nucléotides-sucres</i>	<i>50</i>
IV.2. Synthèse enzymatique	51
<i>IV.2.1. Glycosylation enzymatique d'oligosaccharides, de peptides et de protéines</i>	<i>51</i>
<i>IV.2.2. Synthèse du précurseur UDP-GalNAc</i>	<i>54</i>
<i>IV.2.3. Synthèses oligosaccharidiques avec régénération de l'UDP-sucres</i>	<i>55</i>
IV.3. Synthèse chimio-enzymatique	57
DÉFINITION DES OBJECTIFS	59

MATÉRIEL & MÉTHODES.....	65
I. MATÉRIEL.....	67
II. SYNTHÈSE ET CARACTÉRISATION DES ANALOGUES DE GALNAC	68
III. PRODUCTION DES ENZYMES ET PEPTIDES	78
III.1. Clonage et expression des enzymes	78
III.2. Synthèse des peptides	82
IV. SYNTHÈSE ENZYMATIQUE DES DÉRIVÉS SACCHARIDIQUES	85
IV.1. Synthèse enzymatique des sucres-1-P et des UDP-sucres	85
IV.2. Synthèse enzymatique des glycopeptides.....	86
V. PURIFICATION DES ENZYMES ET PRODUITS.....	87
V.1. Chromatographie d'affinité sur Ni-NTA	87
V.2. Chromatographie échangeuse d'ions	87
V.3. Chromatographie liquide sur C18	88
V.4. Gel filtration.....	88
VI. CARACTÉRISATION DES PEPTIDES ET PRODUITS.....	89
VI.1. Chromatographie sur papier	89
VI.2. Spectrométrie de masse et RMN	89
VII. TESTS ET ANALYSES BIOCHIMIQUES.....	91
VII.1. SDS-PAGE et Western-Blot	91
VII.2. Dosages enzymatiques et détermination des paramètres cinétiques	91
VII.3. Essais d'immunisation et titration en anticorps.....	92
VII.4. Expériences de STD-NMR.....	94
RÉSULTATS ET DISCUSSION	97
I. SYNTHÈSE DU NUCLÉOTIDE-SUCRE UDP-GALNAC.....	99
I.1. Optimisation de la production des enzymes recombinantes.....	99
I.2. Production et caractérisation du nucléotide sucre UDP-GalNAc	102
I.2.1. Article I : « Two-step enzymatic synthesis of UDP-N-acetylgalactosamine » ..	102
I.2.2. Synthèse de [¹⁴C] UDP-GalNAc	107
I.3. Conclusion	110
II. SYNTHÈSE ENZYMATIQUE DE GLYCOCONJUGUÉS.....	111
II.1. Développement du système multienzymatique pour la glycosylation	111
II.1.1. Article II : «Efficient enzymatic glycosylation of peptides and oligosaccharides from GalNAc and UTP »	111
II.1.2. Essais d'optimisation du cycle enzymatique.....	116

II.1.3. Comparaison de la méthode avec la synthèse par voie chimique	118
II.2. Synthèse de glycopeptides et évaluation immunologique	118
II.2.1. Glycosylation enzymatique des peptides	119
II.2.2. Evaluation immunologique des composés d'intérêt thérapeutique	120
II.3. Conclusion	126
III. SYNTHÈSE ET EVALUATION DE SONDAS DE LA PPGALNAC-T1	128
III.1. Synthèse enzymatique d'analogues de l'UDP-GalNAc	128
III.1.1. Choix et synthèse des analogues de GalNAc	129
III.1.2. Exploration du site catalytique de GK2	130
III.1.3. Exploration du site catalytique d'AGX1	131
III.1.4. Synthèse semi-préparative des UDP-sucres	133
III.2. Evaluation biologique des analogues	135
III.2.1. Test de transfert du monosaccharide modifié	135
III.2.2. Estimation des constantes d'inhibition	138
III.3. Analyse STD-NMR de plusieurs ligands	141
III.4. Conclusion	149
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	151
BIBLIOGRAPHIE	157

INCIPALES ABRÉVIATIONS

ABTS	Acide 2,2'-azino-di(3-ethylbenzthiazoline)-6-sulfonique
Abs	Absorbance
Ac	acétyle
AcOEt	Acétate d'éthyle
ACN	ACN
AGX1	UDP-GalNAc pyrophosphorylase
AIBN	Azoisobutyronitrile
Ar	Argon
Arg ou R	Arginine
ATEA	Acétate de triéthylammonium
ATP	Adénosine triphosphate
BSA	Bovine Serum Albumine
Bu	Butyle
CBD	Chitin Binding Domain
CCM	Chromatographie sur couche mince
Ci	Curie
CIP	Calf Intestine Phosphorylase
CK	Créatine Kinase
COSY	COrelated SpectroscopY
CP	Phosphocréatine
cpm	coups par minute
DCM	Dichlorométhane
DMF	<i>N,N</i> -diméthylformamide
DO	Densité Optique
DTT	1,4-dithiothréitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	1-Ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl)-carbodiimide
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
ESI	Electrospray Ionisation
Et	éthyle
EtOH	Ethanol
FLAG	Etiquette peptidique (séquence : DYKDDDDK) reconnue par un anticorps spécifique
Fmoc	9-fluorénylméthylchloroformate
GalN	galactosamine
GalNAc	<i>N</i> -acétylgalactosamine
GK2	GalNAc Kinase
GlcA	Acide Glucuronique
GlcNAc	<i>N</i> -acétylglucosamine
Gly ou G	Glycine
GM1	Ganglioside
GSL	Glycosphingolipide
GTA	Glycosyltransférase A
GTB	Glycosyltransférase B
HMBC	Heteronuclear Multiple-Bond Correlation
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid
Hly	Hydroxyllysine
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
HRP	Horseradish Peroxidase

Hyp	Hydroxyproline
IgG, IgM	Immunoglobuline de type G et M
K_m	constante de Michaelis
LDL	Low Density Lipoprotein
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation
MCS	Multiple Cloning Sites
MeOH	Méthanol
MESNA	Mercapto Ethane Sulfonate de Sodium
cMjTyrRS	Methanococcus naschii tyrosyl-tRNA synthetase
MUC	Mucine
NeuAc	Acide N-acétylneuraminique (acide sialique)
Ni-NTA	Nickel-Nitriloacétate
NOESY	Nuclear Overhausen Effect Spectroscopy
PADRE	Pan HLA-DR universal T helper E pitope
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PMSF	Phénylméthylsulfonyl fluoride
ppGalNAc-Ts	polypeptide <i>N</i> -acétylgalactosaminyltransférases
PPA	Pyrophosphatase inorganique
ppm	partie par million
Pr	Propyle
Rdt	Rendement
RE	Réticulum Endoplasmique
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
SAB	Sérum Albumine Bovine
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SM	Spectrométrie de Masse
SOB	Super Optimal Broth
STD-NMR	Saturation Transfer Difference-Nuclear Magnetic Resonance
Ser ou S	Sérine
sLex	Acide de Lewis
SPPS	Synthèse Peptidique sur Support Solide
T.A	Température Ambiante
TBS	Tris buffered saline
Thr ou T	Thréonine
TTMSS	tris(trimethylsilyl)silane
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
Tyr	Tyrosine
UDP	Uridine diphosphate
UDP-Gal	Uridine diphosphate galactose
UDP-GalNAc	Uridine diphosphate <i>N</i> -acétylgalactosamine
UDP-Glc	Uridine diphosphate glucose
UDP-GlcNAc	Uridine diphosphate <i>N</i> -acétylglucosamine
UPPU	1,2-di(5'-uridine)diphosphate
UTP	Uridine triphosphate

INTRODUCTION

Les glycanes sont des enchaînements linéaires ou branchés de monosaccharides. Ils se présentent sous des formes très diverses et sont indispensables à la vie. Liés aux protéines ou aux lipides, ils sont sécrétés dans le milieu externe ou associés à la membrane plasmique des cellules. Ils servent à protéger le squelette peptidique et la surface cellulaire. Ils sont aussi reconnus de manière très spécifique par des récepteurs physiologiques et se trouvent impliqués dans un grand nombre de processus biologiques comme la reconnaissance et la communication intercellulaire. Le développement des méthodes d'analyse des glycoconjugués a permis de dévoiler progressivement l'extraordinaire diversité des glycanes et a révélé le remarquable potentiel d'informations que représentent ces molécules. La connaissance approfondie des structures glycaniques, de leurs fonctions biologiques et de leurs voies de biosynthèse permet aujourd'hui de trouver de nombreuses applications aux glycoconjugués tant dans le domaine thérapeutique que dans l'alimentaire et la cosmétique. Notamment, grâce aux molécules glucidiques, nous sommes capables de déceler certaines maladies graves telles que le cancer en réalisant un diagnostic plus spécifique et plus précoce, et les thérapies basées sur les molécules portant les glycanes sont plus efficaces et moins lourdes que d'autres utilisées actuellement. Néanmoins, nos connaissances sur l'activité biologique des glycoconjugués sont freinées par un manque d'outils appropriés. Les glycopeptides et les oligosaccharides synthétiques représentent de bons modèles pour mener à bien une étude fonctionnelle. Cependant, la complexité des structures glucidiques ne facilite pas la production de tels mimes, et la plupart du temps, les problèmes de purification et les rendements faibles de synthèse permettent difficilement de réaliser une évaluation biologique du produit synthétisé.

Dans ce contexte, nous avons développé un bioréacteur enzymatique permettant la production efficace de glycoconjugués afin de disposer de mimes synthétiques en quantité suffisante pour une étude fonctionnelle des glycanes.

La *O*-glycosylation de type mucine se définit par la fixation d'un monosaccharide GalNAc sur les sites potentiels de glycosylation des protéines. C'est une étape primordiale dans la biosynthèse des glycoprotéines membranaires et sécrétées et nous souhaitons contribuer à l'étude de ce processus particulier en réalisant la synthèse chimio-enzymatique de sondes et d'inhibiteurs potentiels de la première étape de la *O*-glycosylation. La synthèse et l'incorporation d'analogues de monosaccharides naturels dans des glycopeptides permettront de tester de nouvelles molécules pour leur reconnaissance par les enzymes et les récepteurs.

GÉNÉRALITÉS

I. LE PROCESSUS DE GLYCOSYLATION

La glycosylation est le phénomène qui consiste à greffer des groupements glucidiques, ou encore glycanes sur les protéines et les lipides. C'est l'une des modifications co- et post-traductionnelles les plus importantes dans la synthèse de protéines membranaires et sécrétées. La diversité des monosaccharides constituant les glycanes permet d'envisager une multitude d'assemblages possibles et rend compte de la complexité des structures glycaniques et de leur étude.

I.1. Les différentes structures glycaniques

La quasi-totalité des membranes externes de cellules animales est recouverte d'un manteau cellulaire, le glycocalyx, riche en polysaccharides et dont le rôle est de protéger la cellule des agressions chimiques et mécaniques mais également de régir les interactions intercellulaires. La figure 1 schématise une membrane représentée avec les différentes structures glycaniques que l'on retrouve communément à la surface cellulaire.

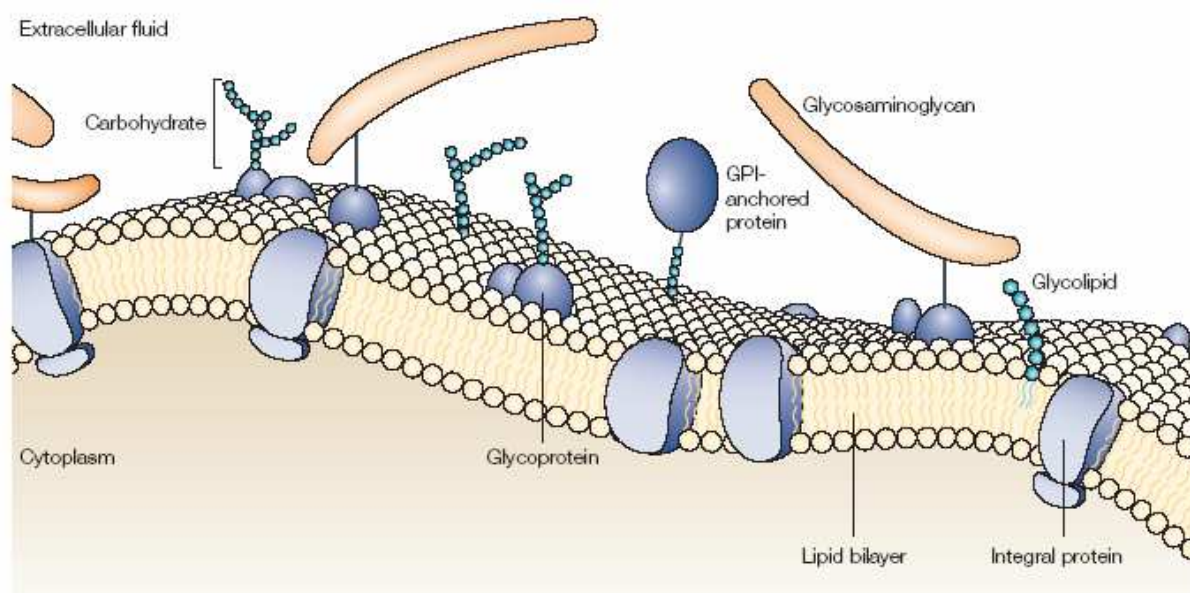


Figure 1. Schéma d'une membrane cellulaire avec les différentes structures glycaniques : glycoprotéines, glycolipides, protéines ancrées sur GPI et protéoglycans portant des glycosaminoglycans (Seeberger et Werz, 2005).

I.1.1. Les glycoprotéines

La glycosylation concerne plus de 50 % des protéines animales. Les glycoprotéines sont réparties dans les différents compartiments cellulaires (cytoplasme, noyau, lysosomes, RE, Golgi ou encore mitochondries), la plupart étant sécrétée ou associée à la membrane plasmique. Parmi les glycoprotéines, on distingue plusieurs grands groupes selon le type d'ancrage ou encore la proportion de glucides.

I.1.1.1. Liaisons glycosidiques

Chez les eucaryotes, il existe deux types principaux de glycosylation : la glycosylation de type *N* et de type *O* selon le type d'ancrage. La *N*-glycosylation consiste à attacher des sucres sur l'azote de la chaîne latérale d'un résidu asparagine de la séquence consensus Asn-X-Ser/Thr (X étant n'importe quel acide aminé, sauf proline) de la chaîne polypeptidique (Marshall, 1974). Dans la *O*-glycosylation, les résidus saccharidiques sont fixés sur l'oxygène d'un aminoacide comportant un groupement hydroxyle (Ser, Thr, Tyr, Hpr, Hly) et à ce jour aucune séquence consensus n'a pu être identifiée. Cependant, ce sont majoritairement et de façon plus variée, les Ser et Thr qui sont glycosylées. Il existe un troisième type de glycosylation : la C-mannosylation qui se caractérise par l'addition d'un α -mannosyl sur un carbone du noyau indole d'un tryptophane (de Beer *et al.*, 1995).

I.1.1.2. Les *N*-glycanes

Les *N*-glycanes sont constitués de trois régions distinctes à savoir le noyau, les antennes et la périphérie. Le noyau, structure pentasaccharidique commune à tous les *N*-glycanes, est d'abord formé par l'enchaînement de deux résidus GlcNAc liés en β 1,4. L'un forme la liaison *N*-glycosidique avec la protéine (par l'asparagine) alors que l'autre est lié à un résidu mannose en β 1,4, lui-même lié à 2 résidus mannose, en α 1,6 et α 1,3 (figure 2). Les antennes sont formées par l'addition de monosaccharides sur les mannoses terminaux. Selon la nature du sucre ajouté, on distingue trois types de structures glycaniques : le type oligomannosidique (addition de résidus mannoses sur le noyau), le type complexe résulte de la liaison de résidus *N*-acétyllactosaminiques (LacNAc : Gal β 1,4 GlcNAc) sur les mannoses terminaux du noyau, et le type mixte qui correspond à un intermédiaire entre les deux autres formes.

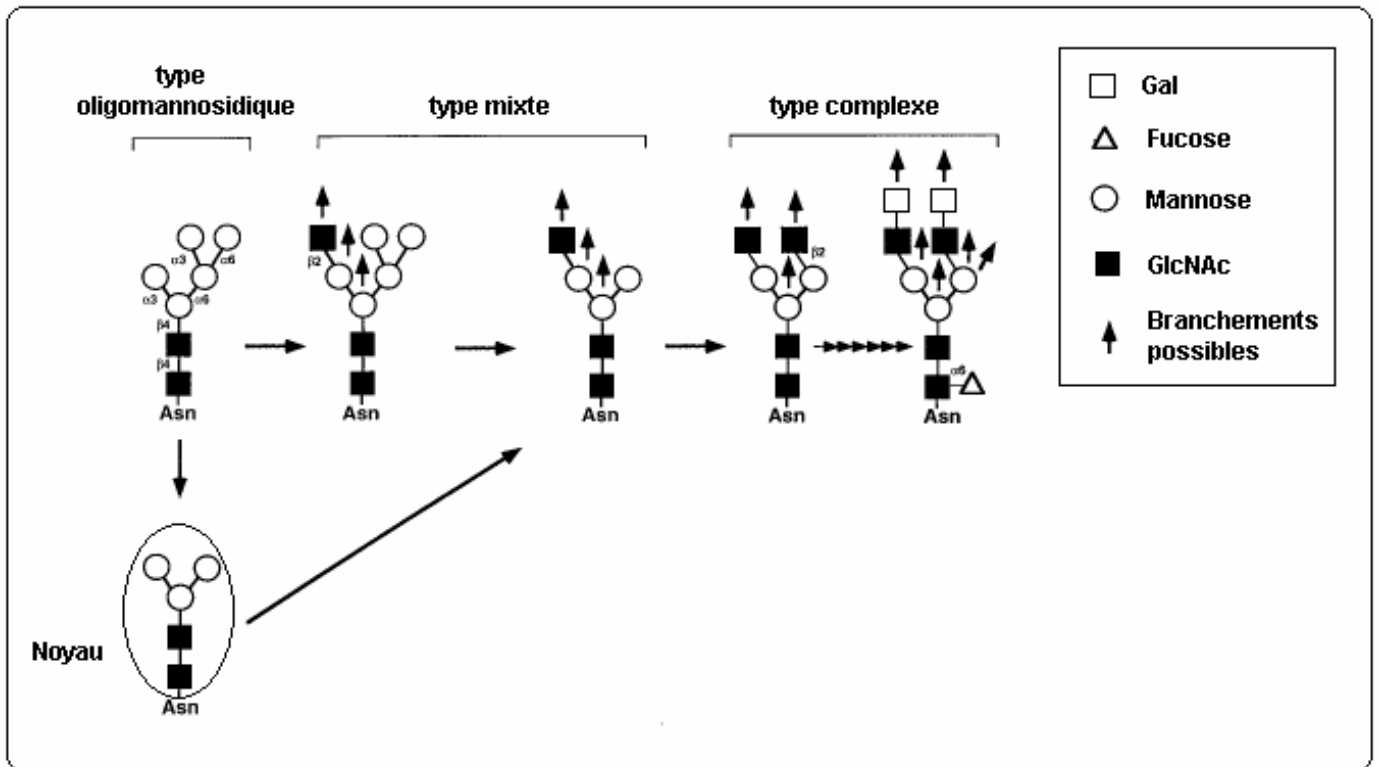


Figure 2. Les trois types de *N*-glycanes : type oligomannosidique, type mixte et type complexe. La plupart des *N*-glycanes sécrétés ou à la surface cellulaire sont du type complexe. Le fucose peut être ajouté à un stade plus avancé que celui indiqué ici (Varki et al., 1999).

La périphérie correspond à l'addition d'autres monosaccharides, principalement les acides sialiques tels que l'acide *N*-acétylneuraminique (Neu5Ac) et le fucose (Fuc).

1.1.1.3. Les *O*-glycanes

Si le rôle des *N*-glycanes est aujourd'hui assez bien connu, la complexité de la *O*-glycosylation rend sa connaissance difficile. En effet, les *O*-glycanes constituent une vaste famille qui peut être divisée en plusieurs sous-groupes: premièrement, les glycanes constitués de GalNAc liés aux résidus Ser et Thr des protéines, et communément appelés les *O*-glycanes de type mucine (*O*- α GalNAc); deuxièmement, les unités GlcNAc liées aux Ser et Thr de protéines cytosoliques ou nucléaires (*O*- β GlcNAc), un troisième type concerne les unités fucose et glucose liées aux Ser et Thr des domaines de facteurs de croissance épidermique d'un grand nombre de protéines ; enfin, il convient également de citer les protéoglycanes (noyau protéique sur lequel se lient de longues chaînes polysaccharidiques non ramifiées) et la *O*-mannosylation présente dans les protéines de mammifères telles que le dystroglycane et dans les glycanes oligomannosidiques de levure. La glycosylation de type mucine (*O*-

α GalNAc) est toutefois la plus répandue et fera l'objet d'une description plus détaillée dans le prochain paragraphe.

I.1.1.3.1. Les *O*-glycanes de type mucine

La glycosylation de type mucine est initiée par la fixation de résidus glucidiques GalNAc sur divers sites potentiels de glycosylation (résidus S et T), et ce jusqu'à atteindre 80% du poids moléculaire de la protéine (Peter-Katalinic, 2005). Ce type de glycosylation apparaît principalement sur les mucines, glycoprotéines qui possèdent des propriétés rhéologiques et hydrodynamiques spécifiques mais également sur d'autres glycoprotéines sécrétées ou membranaires présentes chez les eucaryotes supérieurs. Les mucines sont des protéines de haut poids moléculaire qui tapissent le tractus gastro-intestinal, les voies respiratoires et uro-génitales (Hilkens *et al.*, 1992, Hounsell *et al.*, 1996). Elles possèdent un squelette peptidique riche en séquences répétées ou VNTR (variable number of tandem repeat, 10 à 100 unités) et sont de par nature hyper-glycosylées en particulier sur ce domaine VNTR (Brockhausen, 1999). Ce domaine est propre à chaque mucine mais contient généralement un grand nombre de résidus S, T et P. La présence de prolines et de monosaccharides confère à ces protéines particulières une structure rigide et étendue de 200 à 500 nm qui serait à l'origine du phénomène de lubrification.

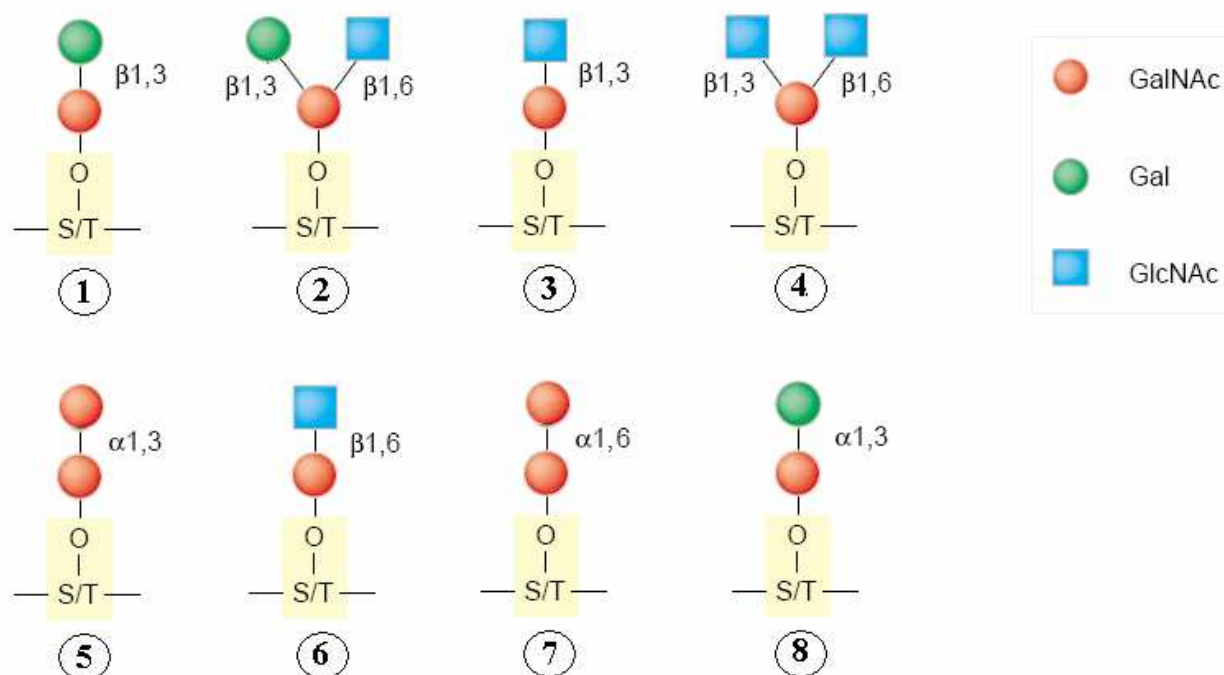


Figure 3. Représentation des différentes structures de cœur des *O*-glycanes de type mucine identifiées jusqu'à présent (Hanisch, 2001).

Une fois le GalNAc fixé sur les résidus S et T de la séquence peptidique, le *O*-glycane peut être allongé via une cascade de réactions enzymatiques qui vont ajouter des unités monosaccharides au premier sucre fixé et donner ainsi naissance à différentes structures de « cœurs » (figure 3).

Ces cœurs peuvent de nouveau être allongés ou modifiés, le plus fréquemment par sialylation, sulfatation, fucosylation ou encore extension par une chaîne de polylectosamine. A noter que l'addition de l'acide sialique est souvent la dernière étape de l'élongation. Ainsi, les oligosaccharides complexes des glycoprotéines ont été divisés en trois régions : le « cœur » qui comprend les deux ou trois premiers oses ancrés à la chaîne peptidique, le « squelette » formé lors de l'élongation puis la « région périphérique » dont la structure complexe peut représenter un antigène.

I.1.1.3.2. Les protéoglycanes

Ils représentent une classe spéciale de glycoprotéines dont la proportion de glucides peut atteindre 95%, ceux-ci se présentant sous la forme d'une ou plusieurs chaînes de glycosaminoglycanes non ramifiées. Les protéoglycanes sont rangés dans différentes catégories selon la nature de la chaîne glycanique et peuvent soit entrer dans la constitution de la membrane plasmique où ils forment de larges complexes, jouant alors un rôle dans les relations cellule-matrice, soit être transportés à l'extérieur de la cellule par exocytose s'intégrant alors à la matrice extracellulaire de manière non covalente sous forme de *chondroïtine-sulfate*, *kératane-sulfate*, *héparane-sulfate* etc...

I.1.1.4. Les protéines glypiées

Observée chez tous les eucaryotes, la réaction de glypiation est une modification consistant à attacher une ancre GPI (*glycosylated phosphatidylinositol*) sur un acide aminé en position C-terminale de protéines fixées à la membrane du RE. Cette ancre GPI est principalement constituée de chaînes saccharidiques mais également d'un phospholipide dont le rôle est d'assurer l'arrimage de la protéine au côté externe de la membrane plasmique.

I.1.2. Les glycolipides

Les motifs oligosaccharidiques présents sur les protéines peuvent également être retrouvés sur les lipides pour former les glycolipides. Ces derniers se divisent en deux familles distinctes selon la nature de la base lipidique : sphingolipide ou glycérolipide (Tableau I). Les sphingolipides (céramides) résultent de l'association d'une sphingosine et d'un acide gras. Ils peuvent être glycosylés en C3 de la sphingosine pour donner différents types de glycosphingolipides (GSL) : les ganglio, isoganglio, globo, isoglobo, lacto, néo-lactocéramides qui se distinguent par la séquence de leurs chaînes glycaniques X (Tettamanti, 2004).

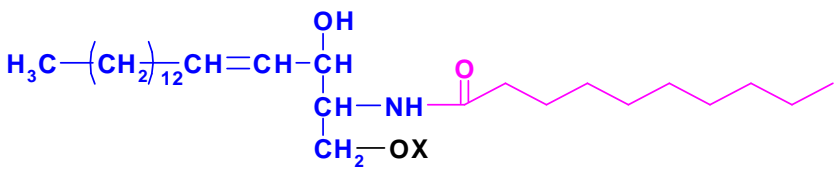
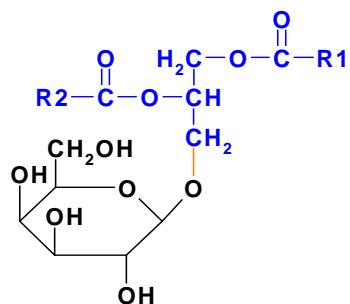
Glycolipides	
glycosphingolipides	glycéroglycolipides
 <p>sphingosine</p>	

Tableau I. Les différents types de glycosphingolipides selon la base lipidique.

Les chaînes oligosaccharidiques des GSL complexes peuvent être linéaires ou branchées et contenir divers monosaccharides tels que Gal, Glc, GalNAc, GlcNAc, Fuc, NeuAc et GlcA. Par exemple, si le résidu X correspond au D-glucose ou D-galactose, il s'agit d'un cérébroside. Les GSL sialylés sont appelés gangliosides. Les glycéroglycolipides ou glycérides qui représentent la deuxième grande classe de glycolipides réalisent quant à eux une liaison O-osidique entre le C3 du glycérol et le C1 du glucide, les groupements R1 et R2 représentant les chaînes carbonées d'acides gras. Ces composés, très rares dans le monde animal, sont surtout représentés chez les végétaux verts.

Ce premier sous-chapitre témoigne de la complexité et de la diversité des structures glycaniques présentes dans la nature. L'obtention de tels complexes oligosaccharidiques nécessite la présence d'une machinerie de biosynthèse organisée qui sera décrite dans le prochain paragraphe.

I.2. Biosynthèse des glycoconjugués

I.2.1. Un processus ordonné et séquentiel

La glycosylation des protéines et des lipides a lieu essentiellement dans la lumière du RE rugueux (modification co-traductionnelle) et de l'appareil de Golgi (modification post-traductionnelle) où elle nécessite de multiples étapes enzymatiques (Tettamanti, 2004, Wopereis *et al.*, 2006). Les enzymes qui catalysent le transfert d'unités monosaccharidiques appartiennent à la famille des glycosyltransférases et sont plus spécifiquement classifiées selon le type de monosaccharide transféré, la position de la liaison formée et la nature du donneur ou de l'accepteur. Etant donnée la diversité des assemblages possibles entre les divers monosaccharides, il n'est pas surprenant qu'au moins 1% du génome humain encode pour des protéines impliquées dans la synthèse des carbohydrates (Freeze, 2006). On peut classer les glycosyltransférases en deux types selon la nature du substrat donneur : les enzymes de type Leloir utilisent des monosaccharides préalablement activés sous forme d'ester de nucléoside diphosphate alors que les autres enzymes (dites non-Leloir) utilisent des glycosyles phosphates. Les nucléotides-sucres utilisés par les glycosyltransférases de type Leloir chez les mammifères sont au nombre de 9 (UDP-Glc, UDP-GlcNAc, UDP-Gal, UDP-GalNAc, UDP-Xyl, GDP-Man, GDP-Fuc, UDP-GlcA et CMP-NeuAc) et leur passage au travers des membranes intracellulaires est réalisé au moyen de transporteurs spécifiques qui constituent un point de contrôle dans la régulation des réactions de glycosylation. La synthèse oligosaccharidique est un processus ordonné et séquentiel faisant intervenir tout un panel de transférases dont les mécanismes catalytiques sont très peu élucidés. Ces enzymes ont une spécificité de substrat souvent étroite et leur localisation intracellulaire très précise nécessite la translocation du glycoconjugué en cours de synthèse d'un compartiment vers le suivant.

Parmi les monosaccharides transférables, le GalNAc est fréquemment rencontré dans les chaînes glycaniques et c'est le premier sucre fixé lors de la *O*-glycosylation de type mucine. Les enzymes responsables du transfert de GalNAc sont les *N*-acétylgalactosaminyltransférases qui utilisent l'UDP-GalNAc comme substrat donneur. Les membres de cette famille se différencient par la nature du substrat accepteur qui peut être peptidique, lipidique ou encore (poly)saccharidique. Le tableau II indique les constantes de Michaelis des différentes transférases de cette famille pour l'UDP-GalNAc. Les valeurs s'échelonnent entre 9,9 et 100 μM selon les enzymes dénotant une catalyse efficace du transfert. Il existe d'autres enzymes dont le rôle majeur est de transférer un autre

monosaccharide que le GalNAc mais qui se sont avérées capables de réaliser ce transfert. C'est le cas par exemple de la LgtA de *Neisseria meningitidis* qui catalyse le transfert de GlcNAc sur des substrats accepteurs dérivés du lactose et dont l'étude a montré qu'elle pouvait également utiliser l'UDP-GalNAc comme source de monosaccharide (Blixt *et al.*, 1999). Cependant, l'efficacité de la réaction est réduite par la faible affinité de l'enzyme pour l'UDP-GalNAc ($K_m = 2400 \mu\text{M}$).

Enzyme	Substrat accepteur (motif)	Type de liaison	K_m UDPGalNAc	référence
EC 2.4.1.40	<u>-fucosyl-(α1,2)- galactoseβ-R</u>	α 1,3	9,9-15 μM	Seto <i>et al.</i> , 1997, Marcus <i>et al.</i> , 2003
EC 2.4.1.41	Polypeptide (résidus <u>S</u> ou <u>T</u>)	α	62-10-29 μM	Wandall <i>et al.</i> , 1997
EC 2.4.1.79	<u>Gal-</u> (α 1,4)-Gal-(β 1,4)- glucosylcéramide	β 1,3	-	Chien <i>et al.</i> , 1973, Taniguchi et Makita, 1984, Okajima <i>et al.</i> , 2000
EC 2.4.1.88	<u>GalNAc-(β1,3)- Gal-(α1,4)-Gal-(β1,4)- glucosylcéramide</u>	α 1,3	100 μM	Kijimoto <i>et al.</i> , 1974
EC 2.4.1.92	NeuAc(α 2,3)- <u>Galβ</u> - glucosylcéramide	β 1,4	35-7 μM	Senn <i>et al.</i> , 1981, Hashimoto <i>et al.</i> , 1993
EC 2.4.1.165	<u>NeuAc-(α2,3)-Gal-(β1,4)-glucosylcéramide</u>	β 1,4	55 μM	Takeya <i>et al.</i> , 1987
EC 2.4.1.174	<u>glucuronyl-(β1,3)-Galβ</u> - protéoglycane	β 1,4	-	-
EC 2.4.1.175	<u>-glucuronyl-(β1,3)-GalNAcβ</u> - protéoglycane	β 1,4	36-50 μM	Kitagawa <i>et al.</i> , 1995, Ninomiya <i>et al.</i> , 2002
EC.2.4.1.223	<u>GlcA-(β1,3)-Gal-(β1,3)-Gal-(β1,4)-Xyβ-O-Ser</u>	α 1,4	27 μM	Kitagawa <i>et al.</i> , 1999
EC 2.4.1.244	<u>GlcNAcβ</u> -glycoprotéine	β 1,4	-	Sato <i>et al.</i> , 2003, Gotoh <i>et al.</i> , 2004

Tableau II. Les divers membres de la famille des α -N-acétylgalactosaminyltransférases représentés avec leur substrat accepteur naturel avec le motif accepteur du GalNAc (en souligné), le type de liaison formé et suivant les données disponibles dans la littérature, la constante d'affinité pour l'UDP-GalNAc.

Parmi ces « GalNAc transférases », la famille la plus vaste correspond aux polypeptide N-acétylgalactosaminyltransférases (ppGalNAc-Ts) qui régulent et contrôlent de manière très précise la O-glycosylation de type mucine.

le cytoplasme, d'une portion transmembranaire hydrophobe comptant environ 20 aminoacides (TM), d'une région tige variant de 20 à 60 résidus riche en Pro et Gly, d'un domaine catalytique constitué de 2 sous-domaines (un motif GT1 et un Gal/GalNAcT, deux zones présentant de fortes homologies de séquence avec d'autres glycosyltransférases), puis d'une partie lectine C-terminale d'environ 130 aminoacides composée de trois sous-unités (α , β et γ), domaine unique aux ppGalNAc transférases et présentant des homologies de séquence et de structure avec la lectine de la ricine (Imberty *et al.*, 1997, Kapitonov et Yu, 1999, Tenno *et al.*, 2002). Les données structurales concernant les ppGalNAc-Ts, et de manière plus générale les glycosyltransférases, sont rares du fait de leur complexité et des nombreux problèmes rencontrés tels que solubilité, protéolyse et difficulté de cristallisation. Cependant, les transférases ppGalNAc-T1, T2 et T10 ont récemment été cristallisées (Fritz *et al.*, 2004, Fritz *et al.*, 2006, Kubota *et al.*, 2006). Les données recueillies n'apportent pas de nouveaux éléments concernant la conformation du substrat donneur dans le site actif mais confirment l'homologie de structure des domaines lectines avec celui de la ricine.

Le transfert de GalNAc, qui a lieu le plus souvent sur les coudes β de la structure secondaire des peptides accepteurs, semble dépendre de l'« accessibilité » du site de glycosylation par la transférase plutôt que d'une éventuelle séquence consensus. La disponibilité des différentes ppGalNAc-Ts est un critère déterminant dans la mesure où ces enzymes sont organo-spécifiques et montrent une sélectivité vis à vis des sites glycosylables. Prenons l'exemple de MUC1 (20-mer) dont la séquence représentée figure 5 contient 5 sites potentiels de glycosylation (3 T et 2 S).

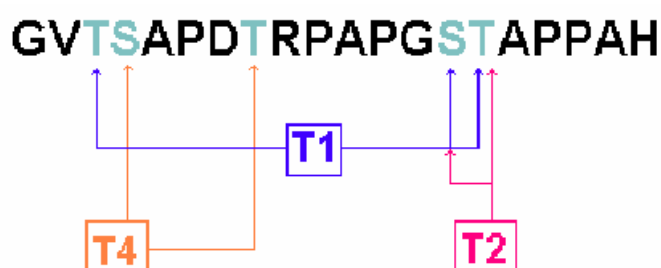


Figure 5. Représentation de la séquence peptidique de MUC1 et de la spécificité de diverses ppGalNAc-Ts vis-à-vis de ce peptide

Wandall et Hanisch ont montré que la ppGalNAc-T1 préfère glycosyler la Thr du motif VTSA mais est aussi capable de glycosyler les résidus Ser et Thr de GSTA (Wandall *et al.*, 1997, Hanisch *et al.*, 1999). La ppGalNAc-T2 quant à elle, transfère le sucre plus rapidement sur la thréonine de GSTA alors que celle du motif VTSA est un moins bon substrat. La Ser

de la séquence VTSA et la Thr dans PDTR ne peuvent pas être glycosylées par ces deux enzymes. La glycosylation extensive de ces positions est possiblement catalysée par une troisième enzyme, la ppGalNAc-T4 qui ressemble à la ppGalNAc-T7 dans sa dépendance aux résidus GalNAc déjà greffés au peptide (Bennett *et al.*, 1998, Hanisch, 2001).

Ces observations confirment l'hypothèse d'un processus séquentiel, les enzymes glycosylant de manière préférentielle les peptides nus sont les « transférases précoces » qui sont les premières à rencontrer la protéine après sa traduction (Bennett *et al.*, 1998). Viennent ensuite les autres transférases qui acceptent plus facilement des peptides déjà glycosylés dans leur site

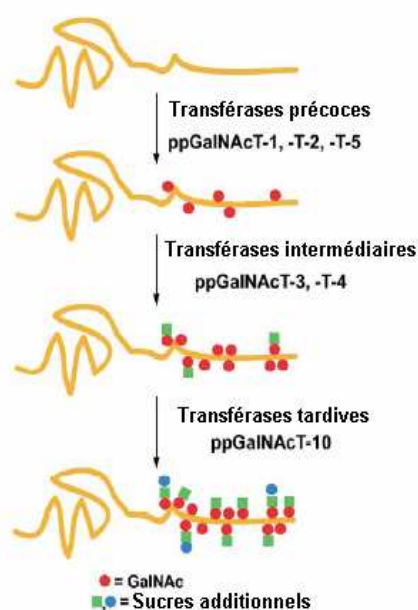


Figure 6. Le processus ordonné de O-glycosylation adapté de Pratt *et al.*, 2004.

actif (figure 6). Les isoformes ppGalNAc-T1, -T2 et -T5 (transférases précoces) montrent une forte préférence pour les substrats non-glycosylés ou monoglycosylés alors que les isoformes ppGalNAc-T3 et -T4 (transférases intermédiaires) acceptent plus facilement des peptides mono ou di-glycosylés avec une faible activité pour les accepteurs portant trois GalNAc. La ppGalNAc-T10 s'est révélée très efficace avec les peptides tri et tétra-glycosylés, elle est l'unique enzyme qui a pu véritablement être répertoriée dans les transférases tardives. Certaines ppGalNAc-Ts ne font pour l'instant pas l'objet de nombreuses études du fait de la difficulté de les produire en quantité suffisante. En ce qui concerne les transférases T1 et T2 dont la spécificité a été le plus

étudiée, il s'avère que la présence de certains acides aminés dans la séquence environnant un site potentiel favorise sa glycosylation (Gerken *et al.*, 2004, Gerken *et al.*, 2006). De manière générale, tous s'accordent à dire que la glycosylation a lieu de façon préférentielle sur les sites à proximité d'un résidu proline et distants des aminoacides chargés. Cependant, un autre paramètre à considérer et qui est en conflit avec ces prédictions basées sur la séquence peptidique est l'influence de la conformation de la glycoprotéine sur la qualité du substrat. La plupart des protéines entrent dans le Golgi après avoir adopté une conformation stable (structures secondaires et tertiaires) et il est raisonnable de penser que seules les Ser et Thr accessibles seront glycosylées. Il a été montré que les peptides qui forment une hélice α sont de mauvais substrats pour les ppGalNAc-Ts (O'Connell et Tabak, 1993) et un résidu S ou T dont l'environnement en aminoacides serait favorable à la glycosylation ne doit pas

nécessairement être accessible *in vivo* du fait de la structure tertiaire adoptée. Les seules prédictions valables concernent les mucines qui adoptent une structure primaire hélicoïdale de type II poly proline. Bien qu'il soit difficile de prédire un profil de *O*-glycosylation, il existe tout de même une panoplie de logiciels (comme « NetOGlyc 3.1 Server », <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>) permettant de prévoir de manière théorique les sites qui pourraient être glycosylés.

Dans le prochain paragraphe, nous allons décrire un autre exemple de biosynthèse de glycanes puisqu'il en sera question dans le travail de thèse. Il s'agit de l'assemblage des antigènes du groupe sanguin humain ABO(H) qui utilise également des transférases de type Leloir.

I.3.3. Biosynthèse des antigènes du groupe sanguin A

La découverte du système ABO en 1901 par Landsteiner a permis d'expliquer pourquoi certaines transfusions sanguines étaient couronnées de succès alors que d'autres se terminaient en tragiques accidents (hémolyse des érythrocytes transfusés).

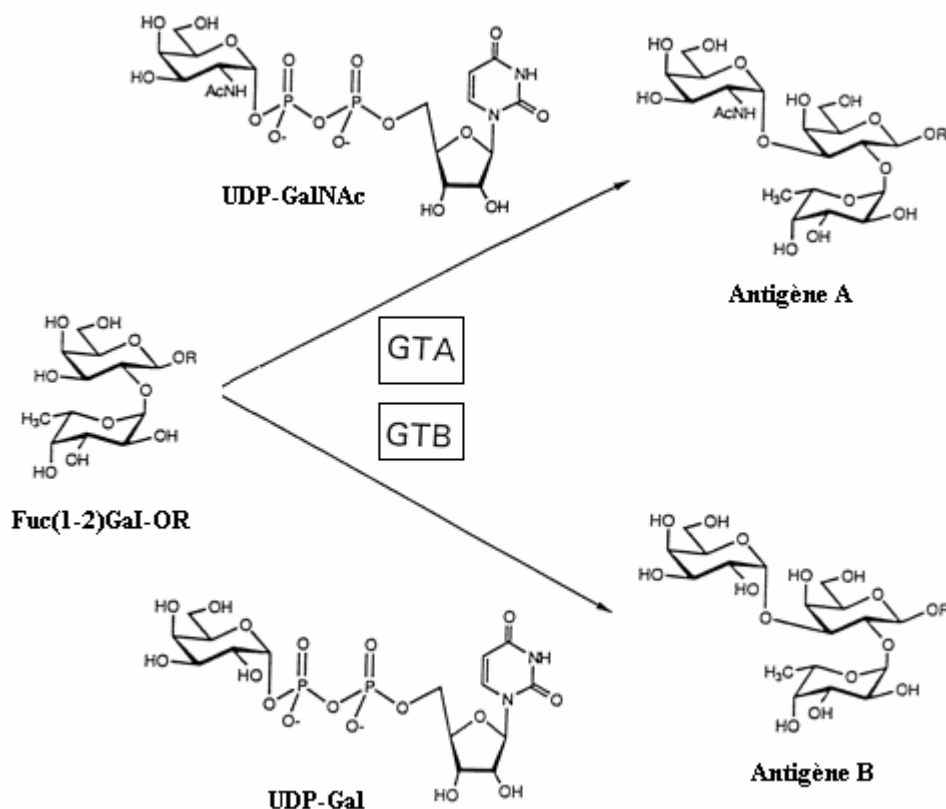


Figure 7. Biosynthèse des antigènes du groupe sanguin A et B. L'enzyme GTA humaine catalyse le transfert de GalNAc sur le précurseur $\text{Fuc}\alpha(1-2)\text{Gal}\beta\text{-OR}$ pour former l'antigène A $\text{Fuc}\alpha(1-2)[\text{GalNAc}\alpha(1-3)]\text{Gal}\beta\text{-OR}$. La GTB catalyse le transfert de Gal pour générer l'antigène B $\text{Fuc}\alpha(1-2)[\text{Gal}\alpha(1-3)]\text{Gal}\beta\text{-OR}$. R = résidu glucidique attaché à une glycoprotéine ou un glycolipide (Seto et al., 1997).

Ce système se définit par la présence ou non d'antigènes A, B ou O à la surface des globules rouges des individus et la présence ou non des anticorps associés dans le sérum. Les antigènes des groupes sanguins A et B représentés figure 7 sont des oligosaccharides, présents sur la membrane des globules rouges, et également sécrétés sous forme soluble dans la salive. Leur biosynthèse est régie par les enzymes: N-acétyl-galactosaminyltransférase et galactosyltransférase codées par les gènes des groupes A et B respectivement, situés sur le chromosome 9. L'enzyme GTA utilise l'UDP-GalNAc pour convertir le trisaccharide accepteur H en antigène A (Tuppy et Staudenbauer, 1966, Hearn *et al.*, 1968, Kobata *et al.*, 1968). Quatre acides aminés la différencient de l'enzyme GTB qui transfère sur le même accepteur une unité galactose à partir d'UDP-Gal pour former l'antigène B (Yamamoto *et al.*, 1990). Ceci témoigne de la spécificité catalytique très fine de ces enzymes.

Nous venons de montrer que la biosynthèse des structures glycaniques était un processus à la fois très organisé mais aussi complexe faisant intervenir un grand nombre de partenaires. La nature n'aurait pas mis au point une machinerie aussi pointue pour l'élaboration de molécules sans intérêt ce qui laisse pressentir du rôle crucial des glycoconjugués *in vivo*.

I.3. Rôle des glycoconjugués *in vivo*

Les glycoconjugués ont une distribution ubiquitaire et sont retrouvés aussi bien en situation extracellulaire qu'en situation intracellulaire. Les réactions de glycosylation modifient les propriétés physico-chimiques d'une protéine ou d'un lipide mais les oligosaccharides représentent surtout des messages qui sont progressivement décodés et qui interviennent dans de multiples fonctions (pour revue, Ohtsubo et Marth, 2006). A l'intérieur de la cellule, les glycoconjugués participent à la modulation fonctionnelle de protéines cytoplasmiques ou nucléaires, au contrôle de la conformation des glycoprotéines sécrétées, ou bien encore ils contribuent à l'adressage de glycoprotéines vers certains compartiments. A la surface de la cellule, les glycoprotéines membranaires, les protéines glypiées, les protéoglycanes et les glycolipides constituent des signaux de reconnaissance permettant des interactions intercellulaires. Ils ont également un rôle majeur dans la fonction, la destinée et la durée de vie des glycoprotéines sécrétées.

I.3.1. Rôle de modulateurs chimiques et physico-chimiques

La présence de chaînes glycaniques sur les protéines affecte certaines de leur propriétés telles que conformation, solubilité et stabilité (Lis et Sharon, 1993, Seitz, 2000, Helenius et Aebi, 2004, Mitra *et al.*, 2006).

Les chaînes glycaniques facilitent l'hydratation des protéines par rétention d'eau et stabilisent la conformation tridimensionnelle de la protéine en réalisant des interactions parfois nécessaires au repliement de la protéine dans sa conformation active. En outre, les sucres présentent une hydrophilie qui permet d'augmenter la solubilité de la protéine dans les milieux aqueux et évite dans certains cas la formation d'agrégats insolubles. Nombre de glycoprotéines, lorsqu'elles sont dépourvues de leur sucres, ne sont plus correctement secrétées. Les saccharides qui sont souvent répartis de manière homogène à la surface des protéines constituent une véritable barrière protectrice qui maintient la stabilité des protéines et leur confère une résistance à la chaleur et à l'attaque protéolytique. On peut citer l'exemple du facteur de stimulation des colonies du granulocyte humain (G-CSF), qui contient un *O*-glycane qui empêche la molécule de polymériser à 37°C et de se dénaturer à la chaleur (Oheda *et al.*, 1990). Il a été démontré aussi que la chaîne *O*-glycanique de ce facteur, de par sa proximité vis-à-vis du résidu Cys-17, protège cette cystéine de l'oxydation radicalaire en empêchant les radicaux libres d'attaquer le groupe sulfhydryle déprotoné (Hasegawa, 1993). On peut aussi citer l'exemple des mucines qui sont naturellement hyper-glycosylées et forment des réseaux enchevêtrés composés de gels visqueux et élastiques qui protègent et lubrifient les membranes muqueuses qui les secrètent.

I.3.2. Facteurs de transport et d'adressage

Il est maintenant bien connu que l'une des fonctions des glycanes est de servir de facteur d'adressage. D'ailleurs un grand nombre de *O*-glycanes sont impliqués dans le trafic intracellulaire des protéines au niveau de la membrane apicale (Potter *et al.*, 2006). Dans le complexe Golgien, les protéines lysosomiales sont spécifiquement marquées par des résidus mannoses phosphorylés en position 6 (Man-6-P) (Ghosh *et al.*, 2003) qui dirigent ces protéines vers le lysosome par des lectines spécifiques ou récepteurs de Man-6-P (Kornfeld, 1992). Les glycoprotéines qui n'ont pas cette étiquette sont quant à elles secrétées ou transportées sur la membrane plasmique. Un autre exemple est celui des cellules sanguines vieillies qui perdent leurs résidus d'acide sialique et sont ainsi reconnues puis détruites par les

macrophages du foie et de la rate qui possèdent des récepteurs membranaires aux asialoglycoprotéines (Ashwell et Morell, 1974).

I.3.3. Processus biologiques

Les glycanes interagissent de manière très spécifique avec les récepteurs physiologiques et jouent de ce fait un rôle prépondérant dans un grand nombre de processus biologiques (Varki, 1993). Ils se lient notamment avec des protéines spécifiques de la reconnaissance des sucres appelées lectines mais peuvent également interagir avec d'autres structures saccharidiques pour induire par exemple des répulsions inter-cellulaires (figure 8).

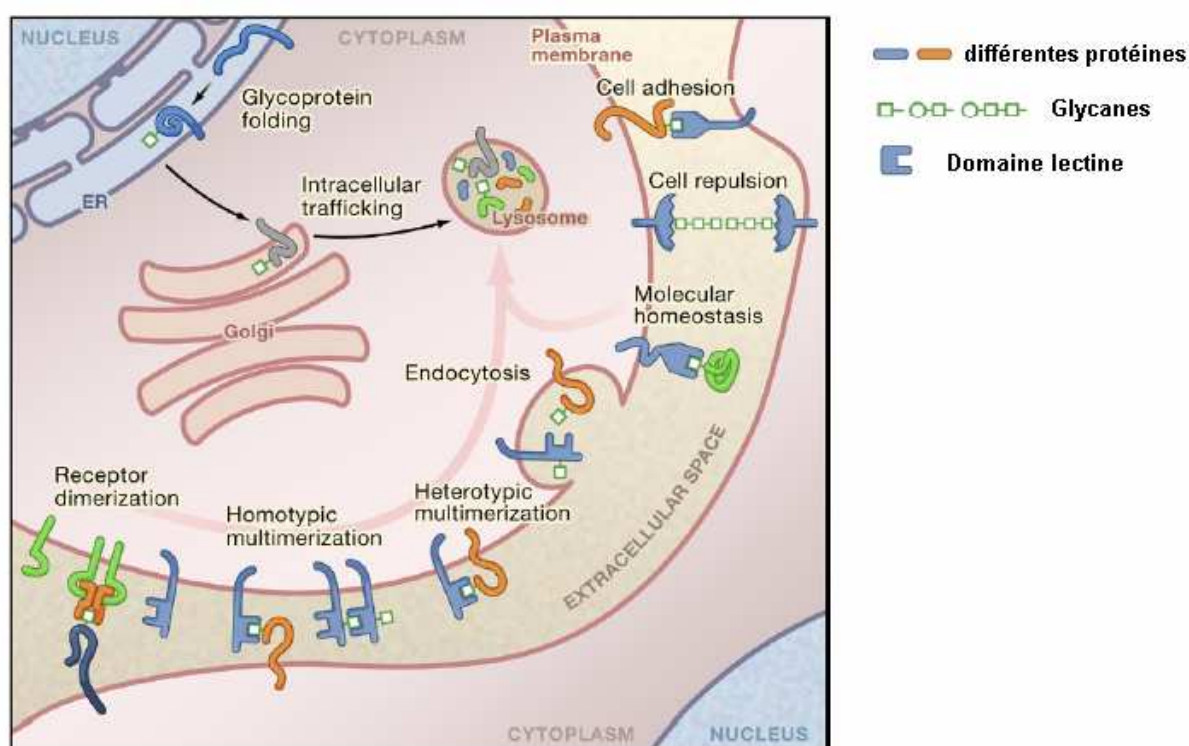


Figure 8. Fonction des glycanes dans les mécanismes cellulaires (Ohtsubo et Marth, 2006).

Plusieurs études ont montré que les glycanes participaient à l'adhésion cellulaire lors de phénomènes variés tels que la fécondation, l'interaction microbe-hôte ou encore lors d'une infection virale (Miller *et al.*, 1992, Hooper et Gordon, 2001, Sullivan *et al.*, 2005). Lors d'une inflammation par exemple, les leukocytes sont amenés jusqu'au tissu infecté qui relargue des cytokines. Ces dernières vont stimuler l'expression de deux protéines : les sélectines E et P qui reconnaissent le tétrasaccharide sLex et ses dérivés sulfatés présents à la surface des leukocytes et vont favoriser l'adhésion de ces derniers sur les cellules endothéliales endommagées (Lowe, 2003).

Le peptide MUC2 qui est une mucine hyper-glycosylée intervient dans l'homéostasie intestinale (Velcich *et al.*, 2002). Le rôle de récepteur qu'on a longtemps attribué aux GSL est controversé mis à part quelques exemples comme le GM1 connu pour être le récepteur d'une toxine du choléra (Van Heyningen, 1974). Récemment, les études ont montré que les GSL agissent plutôt comme récepteurs auxiliaires dans l'activité biologique de certaines protéines (Rusnati *et al.*, 2002).

I.3.4. Structures glycaniques et maladies

Nous avons vu précédemment que les enzymes impliquées dans la biosynthèse des oligosaccharides représentaient une part considérable du génome humain. Bien que certaines mutations de ces gènes semblent n'avoir aucune conséquence pathologique, probablement du à un large recouvrement de la spécificité de substrat entre diverses enzymes, la perte d'autres gènes se révèle catastrophique, conduisant le plus souvent à des syndromes léthaux.

Par exemple, des mutations du gène *SIAT9*, un gène encodant une sialyltransférase impliquée dans la synthèse du ganglioside GM3 (NeuAc-Gal-Glc-céramide), sont à l'origine de syndromes épileptiques et de cécité (Simpson *et al.*, 2004). C'est le premier cas connu de pathologie issue d'un dysfonctionnement dans la biosynthèse de GSL alors que les syndromes causés par une déficience en enzymes impliquées dans la dégradation lysosomale des GSL sont plus communs (maladie de Tay-Sachs, maladie de Sandhoff et de Fabry, Schuette *et al.*, 1999).

Le cancer est une autre illustration des conséquences dramatiques que peut avoir une anomalie dans la glycosylation. Dans les cellules cancéreuses, la glycosylation des mucines attachées à la membrane peut être altérée. C'est le cas de MUC1, une glycoprotéine transmembranaire, exprimée en position apicale des cellules épithéliales. Identifiée pour la première fois dans le lait maternel (Shimizu et Yamauchi, 1982), c'est la première mucine dont le gène a été séquencé (Gendler *et al.*, 1990, Lan *et al.*, 1990, Ligtenberg *et al.*, 1990, Wreschner *et al.*, 1990). Le domaine extracellulaire contient le domaine VNTR dont la séquence, constituée de 20 acides aminés "PPAHGVTSAPDTRPAPGSTA", peut être répétée de 25 à 125 fois.

Dans les tumeurs humaines d'origine épithéliale, MUC1 est sur-exprimé dans des formes *O*-glycaniques tronquées et sous glycosylées et la dépolarisation de la cellule

cancéreuse entraîne une répartition homogène de MUC1 à la surface cellulaire (figure 9). Cette aberration dans la structure glycanique peut s'expliquer par un changement dans l'expression des différentes glycosyltransférases durant la progression du cancer. En particulier, les sialyltransférases qui stoppent l'élongation de la chaîne voient leur activité augmentée, ce qui expliquerait la présence de formes tronquées.

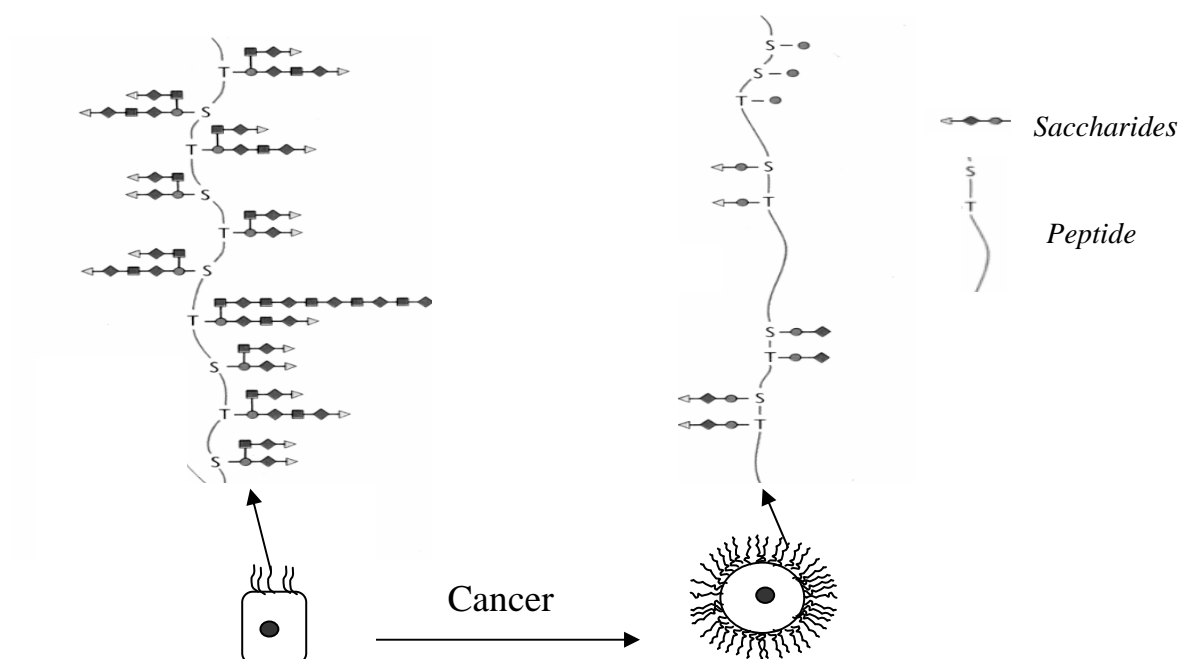


Figure 9. Représentation schématique de l'expression de MUC1 dans les cellules épithéliales saines et les cellules épithéliales tumorales.

Les structures glycaniques sont les facteurs majeurs de la reconnaissance cellulaire et remplissent des fonctions vitales pour notre organisme. En outre, il semblerait qu'une anomalie dans la structure oligosaccharidique soit souvent à l'origine de maladies infectieuses et auto-immunes. Bien que la compréhension que nous avons des fonctions biologiques des glucides soit encore très restreinte, les découvertes réalisées au cours de ces dernières décennies laissent entrevoir les applications potentielles des glycoconjugués.

II. DE L'ÉTUDE FONCTIONNELLE DES GLYCANES AUX APPLICATIONS THÉRAPEUTIQUES

Tous les processus faisant intervenir d'une manière ou d'une autre les glycanes représentent des cibles thérapeutiques potentielles, et les médicaments à base de glucides ne cessent de bourgeonner dans l'industrie pharmaceutique (Shriver *et al.*, 2004, Gornik *et al.*, 2006). Les développements récents en glycobiologie en facilitant l'analyse et la synthèse des oligosaccharides n'ont fait qu'accroître ce phénomène et de nombreux composés glucidiques sont d'ores et déjà en essais cliniques. Les domaines concernés sont le domaine thérapeutique mais également l'alimentaire et la cosmétique : les tensioactifs biocompatibles témoignent du succès croissant de l'emploi des carbohydrates. Mais l'utilisation des sucres pour améliorer notre quotidien et nos conditions de vies n'est pas nouvelle : l'héparine, une chaîne oligosaccharidique anti-coagulante, est utilisée depuis 1930 pour empêcher la formation de caillots de sang.

Nous l'avons vu précédemment, ce sont les connaissances progressives que nous avons de la fonction biologique des structures glycaniques qui permettent de trouver des applications potentielles. Il faut donc dans un premier temps, identifier les glycoconjugués bioactifs *in vivo*, déterminer leur structure et les caractériser. L'intérêt est ensuite de reproduire de manière synthétique la molécule ou du moins de s'en approcher le plus possible afin de disposer de mimes ou de modèles pour pouvoir les étudier et/ou les utiliser en thérapie. L'étude de ces mimes et de leurs conséquences biologiques permet par la suite d'optimiser la molécule dans le cadre par exemple de l'élaboration d'un vaccin anti-cancéreux (figure 10).

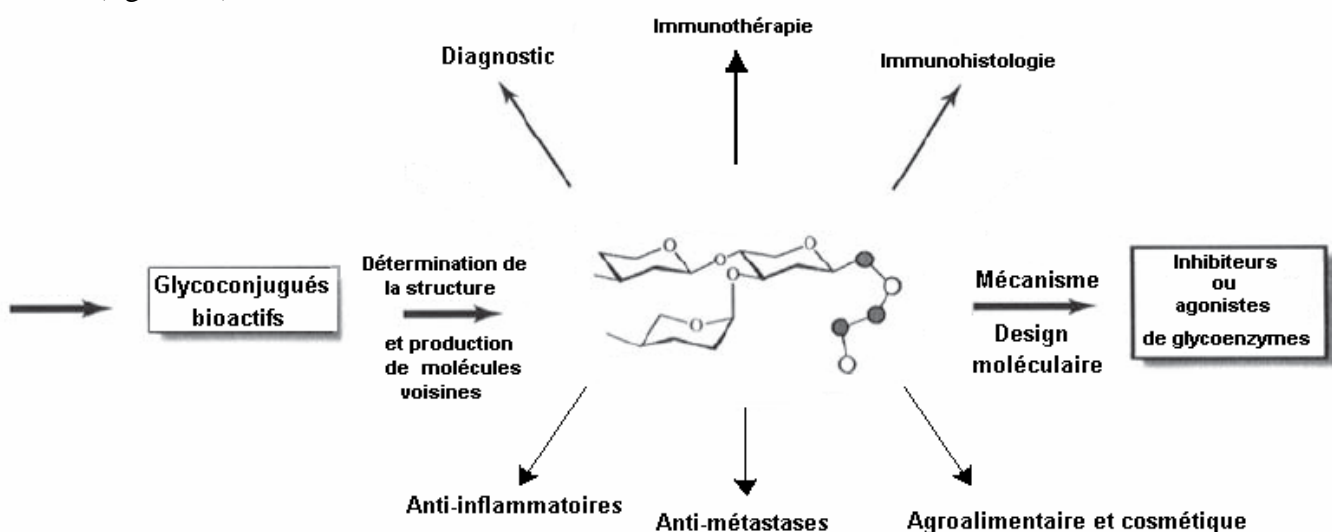


Figure 10. Les divers domaines d'applications possibles des glycoconjugués synthétiques.

Cependant, la complexité des glucides ne permet pas toujours de produire les molécules bioactives. Par exemple, pendant plusieurs années, la société Amgen a commercialisé un médicament contre l'anémie, l'érythropoïétine, et jetait 80% de sa production à cause d'une glycosylation inadéquate qui conduisait à une destruction rapide du produit *in vivo*. Grâce aux nouvelles méthodes de synthèse, deux sucres ont pu récemment être ajoutés à l'ancien médicament le rapprochant ainsi de sa structure naturelle. Cette nouvelle version médicamenteuse a une durée de vie dans le sang beaucoup plus longue ce qui nécessite des prises moins fréquentes (Maeder, 2002).

Cela fait maintenant 100 ans que les premières tentatives visant à stimuler le système immunitaire pour éradiquer le développement des cancers, ont été entreprises. Depuis, deux approches se sont développées : l'immunothérapie active cherchant à stimuler le système immunitaire et l'immunothérapie passive fondée sur l'injection d'anticorps ou de cellules activées *in vitro*. L'immunothérapie active consiste à présenter au système immunitaire des antigènes tumoraux synthétiques, ceci afin de stimuler une réponse immunitaire spécifique contre une cible tumorale. On peut alors induire une réponse immunitaire en stimulant la prolifération de lymphocytes T cytotoxiques ou alors induire la production d'anticorps. Les formes glycosylées plus ou moins courtes retrouvées à la surface des cellules cancéreuses font apparaître de nouveaux épitopes antigéniques dont les plus communs sont représentés figure 11. Par exemple, l'altération caractérisée par une absence totale d'élongation du résidu GalNAc fixé au polypeptide a reçu le nom d'antigène Tn. Cet antigène peut éventuellement être sialylé pour former l'antigène sialyl-Tn (α 2-6 sialylation). Ces antigènes ont été identifiés comme marqueurs de la malignité d'une cellule notamment dans les cancers du colon, du sein et de l'ovaire (Springer, 1984, Takahashi *et al.*, 1988). Leur expression limitée sur les tissus normaux en font de véritables cibles pour l'immunothérapie du cancer (MacLean *et al.*, 1996). Combinés à la forme tumorale MUC1, elle aussi considérée comme cible potentielle pour l'immunothérapie antitumorale, les glycopeptides synthétiques ainsi formés offrent de nombreuses possibilités pour le design et l'élaboration d'un vaccin efficace (Syrigos *et al.*, 1999, Taylor-Papadimitriou *et al.*, 1999, Baldus *et al.*, 2004, Acres et Limacher, 2005, Hanisch et Ninkovic, 2006).

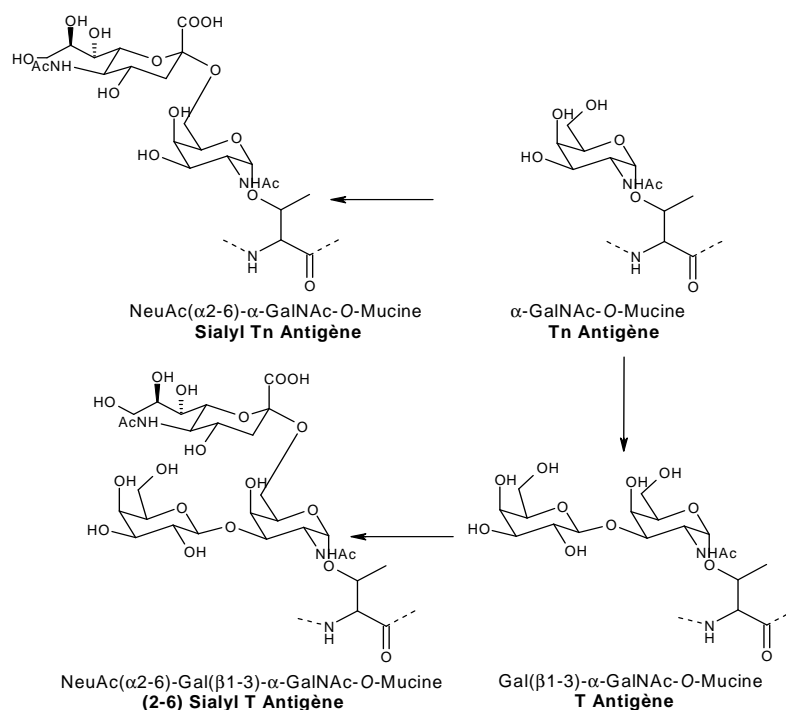


Figure 11 : Chaînes O-glycaniques des mucines dans les cellules tumorales, d'après Hanisch et al., 1996.

Nous avons évoqué longuement les glycopeptides car il en sera question dans le travail de thèse mais ce ne sont pas les seules molécules potentiellement utilisables dans une thérapie anti-cancéreuse comme illustré tableau III. Les gangliosides ont également prouvé leur efficacité en terme d'antigénicité et certains d'entre eux sont d'ores et déjà utilisés en essais cliniques.

Tumor	Antigens ^a
Melanoma	GM2, GD2, GD3
Neuroblastoma	GM2, GD2, GD3, polysialic acid
Sarcoma	GM2, GD2, GD3
B cell lymphoma	GM2, GD2
Small-cell lung cancer	GM2, fucosyl GM1, polysialic acid, globo H, sialyl Le ^a
Breast	GM2, globo H, Le ^y , TF
Prostate	GM2, Tn, sTn, TF, Le ^y
Colon	GM2, Tn, sTn, TF, sialyl Le ^a , Le ^y
Ovary	GM2, globo H, sTn, TF, Le ^y
Stomach	GM2, Le ^y , Le ^a , sialyl Le ^a

Tableau III. Epitopes antigéniques pour la construction de vaccin anti-cancéreuse, d'après Livingston et al., 2000. a. Antigènes présents sur au moins 50% des cellules cancéreuses chez au moins 60% des biopsies.

Une autre application des glucides consiste à utiliser des mimes de saccharides naturels comme inhibiteurs ou agonistes de glycoenzymes. Ceci passe par des études préliminaires du mécanisme d'action de ces enzymes ainsi que par un design moléculaire du substrat. Par exemple, le virus de la grippe entre dans les cellules en se fixant sur un sucre (acide sialique) présent sur les glycoprotéines de surface. Cette liaison au sucre permet en quelque sorte de tourner une clé et d'ouvrir une porte au virus qui peut alors pénétrer dans les cellules et de se répliquer. Quand les nouveaux virus formés sortent de la cellule ils peuvent être captés par ce même sucre et doivent recruter une enzyme (neuraminidase) s'ils veulent se libérer. Deux produits actuellement sur le marché, le Tamiflu® (oseltamivir) et le Relenza® (zanamivir), raccourcissent la durée de la grippe en se fixant très fortement au site actif de cette enzyme, l'empêchant ainsi de libérer le virus qui aura alors du mal à infecter d'autres cellules (Moscona, 2005).

Conscients de l'importance des glucides dans la santé humaine et les maladies, un nombre croissant de chercheurs ont depuis peu rassemblé leurs efforts pour tenter de mieux comprendre les détails de la structure et de l'activité des glycoconjugués afin de pouvoir transférer ces découvertes à de nouveaux agents thérapeutiques. Parmi les domaines qui restent encore très peu explorés, la *O*-glycosylation prend une place importante d'une part par sa complexité et d'autre part par l'étendue des réactions de glycosylation dont elle fait l'objet.

III. LA O-GLYCOSYLATION : UN DOMAINE À EXPLORER

Il apparaît clairement que les connaissances acquises sur la *N*-glycosylation tant du point de vue structural que fonctionnel ont de loin dépassé celles de la *O*-glycosylation qui reste aujourd'hui peu exploitée faute d'outils performants. Pour les *N*-glycanes, l'existence d'une séquence consensus bien définie facilite le développement de techniques d'étude (mutation des aminoacides de cette séquence consensus, clivage enzymatique des complexes *N*-glycaniques...). Pour la *O*-glycosylation, ceci n'est pas réalisable. Certes, il existe une enzyme capable de couper la chaîne *O*-glycanique mais sa spécificité est restreinte à la structure glycanique $\beta\text{Gal}(1,3)\alpha\text{GalNAc-1-Ser/Thr}$ (Kobata, 1979) et ne permet donc pas d'étudier l'ensemble des *O*-glycanes. Dans une autre approche, des cellules déficientes en UDP-GlcNAc épimérase ont été utilisées afin d'étudier le rôle des *O*-glycanes liés aux LDL (Kozarsky *et al.*, 1988). Cette approche permet de déterminer le rôle fonctionnel des *O*-glycanes mais n'apporte aucun élément sur les mécanismes réactionnels mis en jeu.

La découverte d'un inhibiteur efficace de la *O*-glycosylation par analogie à la tunicamycine pour la *N*-glycosylation faciliterait grandement l'étude des *O*-glycanes et permettrait le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques (Bertozi et Kiessling, 2001). De même, la production de glycopeptides synthétiques en quantité importante permettrait d'étudier les propriétés de ces molécules *in vitro* et *in vivo*. Ce chapitre vise à montrer les différentes approches qui sont développées à l'heure actuelle pour étudier le phénomène de *O*-glycosylation.

III.1. Recherche d'un inhibiteur

La tunicamycine est un inhibiteur puissant de la *N*-glycosylation. Ce type de glycosylation requiert des intermédiaires constitués de mono- et d'oligosaccharides liés au dolichol phosphate. Ce lipide, inséré dans la membrane plasmique, est relié par un groupement phosphate au précurseur glucidique de la chaîne glycanique qui va être liée en *N*. Lors de la biosynthèse des glycoprotéines, lorsqu'un polypeptide portant la séquence consensus de *N*-glycosylation entre dans la lumière du RE, une enzyme spécifique vient décrocher la chaîne glycanique du dolichol phosphate et la greffer sur le résidu Asn de la séquence peptidique consensus. La tunicamycine intervient lors de la première étape de la synthèse du dolichol-PPGlcNAc, inhibant ainsi la formation de cet intermédiaire

liposaccharidique (Elbein, 1987a, Elbein, 1987b). La découverte d'une telle molécule a révolutionné les connaissances que nous avons sur les *N*-glycoprotéines et reste aujourd'hui un outil de choix pour l'étude des *N*-glycanes.

Cependant, il n'existe à ce jour aucune molécule de cet acabit pour étudier la *O*-glycosylation. Le challenge serait de trouver une petite molécule inhibitrice de la première étape de la *O*-glycosylation. Bien sûr, maintes molécules ont été synthétisées dans cet objectif. Pour ne pas s'étendre à un nombre trop important de molécules, nous nous attacherons uniquement à décrire celles relatives à l'inhibition des ppGalNAc-transférases donc à la *O*-glycosylation de type mucine. En d'autres termes, le candidat idéal serait un analogue d'UDP-GalNAc qui soit inhibiteur de l'enzyme. Des études *in silico* ont été réalisées dans notre laboratoire avec la ppGalNAc-T1 bovine (Duclos *et al.*, 2004). Un modèle du site de reconnaissance de l'UDP-GalNAc de l'enzyme a été construit dans lequel l'UDP-GalNAc et l'ion cofacteur Mn^{2+} ont été fixés (Figure 12). Dans ce modèle, l'UDP-GalNAc adopte une conformation où le GalNAc se retrouve en dessous des phosphates et maintenu dans une conformation spéciale via des liaisons hydrogènes avec le résidu Arg193 et des interactions hydrophobes avec deux résidus leucines. D'autre part, le ribose est lié à l'enzyme via des liaisons faibles de Van Der Waals. L'uracile est en interaction avec un tryptophane et forme une liaison hydrogène avec une asparagine. Ce modèle moléculaire du site de fixation de l'UDP-GalNAc construit d'après les homologies structurales observées avec d'autres glycosyltransférases de structure tridimensionnelle connue et testé par mutagenèse dirigée indique qu'un groupement hydroxyle (en C-3) et le CO du groupement N-acétyle du GalNAc sont impliqués dans la reconnaissance du substrat et que les distances séparant le GalNAc et le site actif sont très faibles.

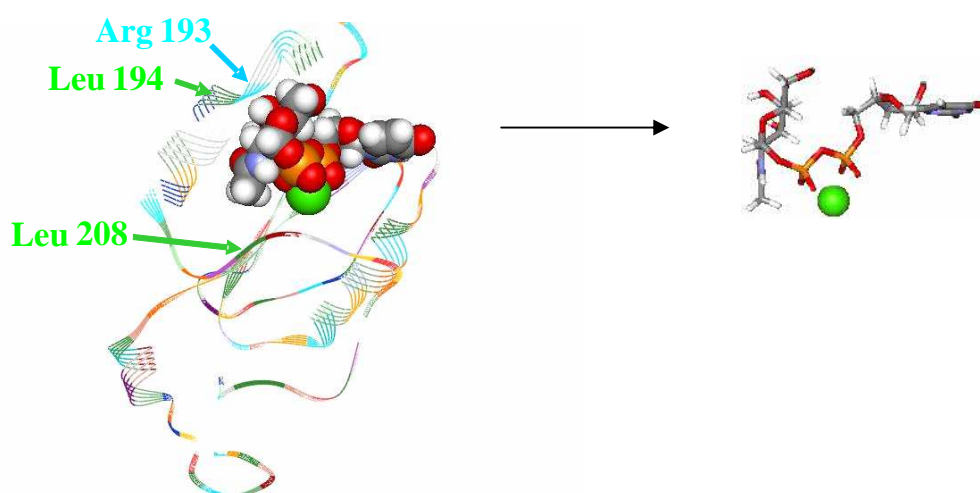


Figure 12. Représentation du modèle moléculaire du site de fixation de l'UDP-GalNAc par la ppGalNAcT1 bovine en présence du substrat et du cofacteur Mn^{2+} (Duclos *et al.*, 2004).

En 2004, Fritz *et al* ont reporté la structure cristallographique des domaines catalytique et lectine de l'isozyme ppGalNAc-T1. Malheureusement, ils n'ont pas réussi à cristalliser l'enzyme en présence de substrats, seul l'ion Mn^{2+} étant présent dans la structure, même si le cristal avait été formé en présence d'UDP-GalNAc. Par conséquent, ces données cristallographiques n'apportent pas d'informations supplémentaires sur la reconnaissance du substrat accepteur et le mécanisme catalytique. Cet échec démontre une fois de plus l'intérêt de disposer d'un inhibiteur de ces enzymes car la cristallisation serait alors beaucoup plus informative et permettrait d'avoir des informations sur le mécanisme réactionnel. Cette même équipe a publié des données cristallographiques relatives à la ppGalNAc-T2 dans laquelle l'enzyme a pu cette fois être complexée avec un peptide accepteur et l'UDP, mais toujours pas l'UDP-GalNAc (Fritz *et al.*, 2006). Une autre enzyme, la ppGalNAc-T10, a elle aussi été cristallisée, en complexe avec l'UDP, le GalNAc et l'ion divalent (Kubota *et al.*, 2006). Une information significative y a été apportée grâce à la présence dans le cristal d'UDP et de GalNAc provenant de l'hydrolyse, durant la cristallisation, de l'UDP-GalNAc introduit. La partie GalNAc est stabilisée dans la poche catalytique par 8 liaisons hydrogènes avec la protéine ainsi que par une interaction entre le *N*-Acétyle, une histidine et une glycine, ces interactions marquant la spécificité de l'enzyme pour l'UDP-GalNAc. Il s'agit en fait de la chaîne principale d'un résidu Gly qui reconnaît le groupement carbonyle du GalNAc en position 2 et le noyau imidazole du résidu His qui stabilise le groupement méthyle. Là encore, tout comme dans le modèle moléculaire on retrouve l'uridine stabilisée par des liaisons hydrogènes mais également par des liaisons faibles de type Van der Waals ou hydrophobe. Le résidu Glu du motif WGGE, motif particulièrement conservé dans la famille des ppGalNAc-Ts, joue un rôle crucial dans la reconnaissance du GalNAc en interagissant avec les groupements hydroxyles en C4 et C6.

Afin de trouver un inhibiteur efficace qui permettrait de disposer de l'enzyme cristallisée dans sa conformation active, de nombreux chercheurs ont synthétisé des molécules dérivées de l'UDP-GalNAc. Nous nous intéresserons uniquement aux modifications apportées à la partie saccharidique. Ces modifications sont diverses et concernent majoritairement la chaîne en C-2 mais on voit également des changements de groupes fonctionnels en C-3, C-4 et C-6 (figure13).

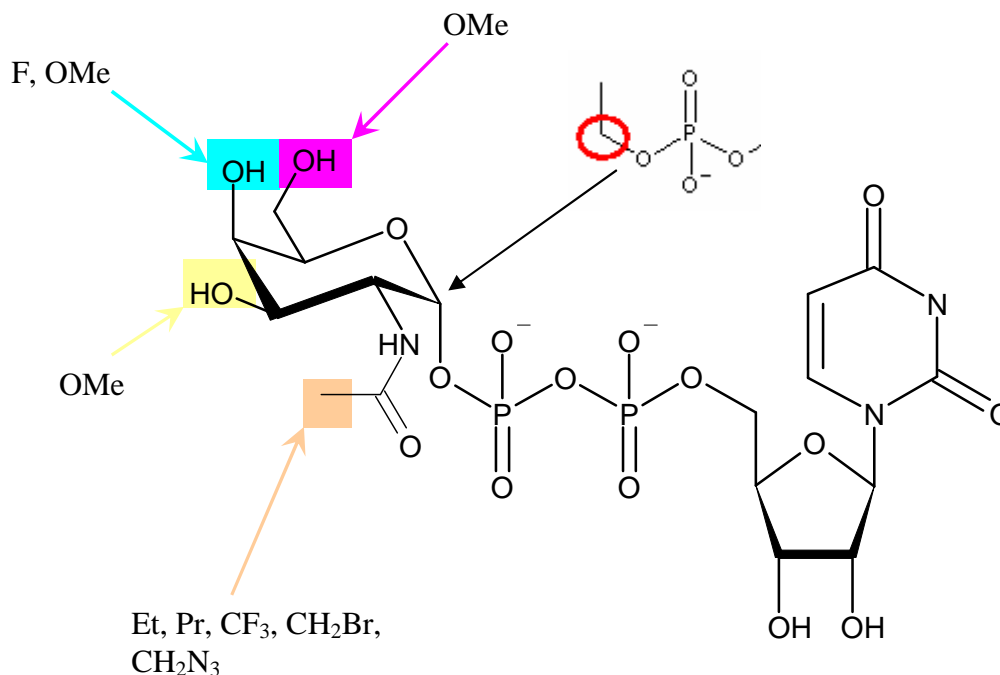


Figure 13. Représentation du substrat donneur UDP-GalNAc avec les modifications de structure publiées dans la littérature.

Parfois même, les analogues ont une structure très éloignée de celle de l'UDP-GalNAc : les molécules (1, 2 et 3) synthétisées dans l'équipe de C. Bertozzi sont par exemple de bons inhibiteurs des ppGalNAc-Ts (figure 14).

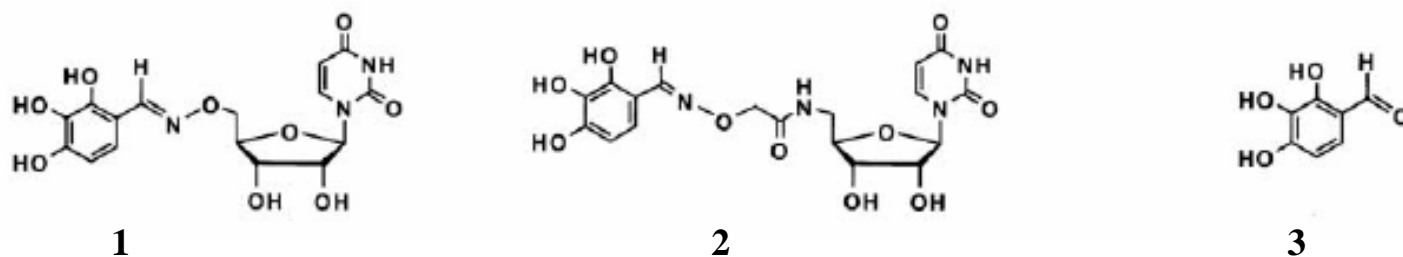


Figure 14. Structures des inhibiteurs développés par l'équipe de C. Bertozzi (Hang et al., 2004b).

Le tableau IV rassemble les rendements de synthèse ainsi que les données enzymologiques publiées sur les analogues de l'UDP-GalNAc envers la ppGalNAc-T1. Malheureusement, les rendements faibles de synthèse ainsi que les difficultés rencontrées lors de la purification des produits ne permettent pas, dans la majorité des cas, de tester les molécules sur les enzymes. De manière générale, la synthèse des UDP-sucres, souvent réalisée par voie chimique, s'avère difficile avec des rendements ne dépassant pas 32 % sauf pour le cas des molécules 1 et 2 qui sont aisément obtenues en une étape à partir de l'aldéhyde 3 commercial. Ces rendements de synthèse pourraient être nettement améliorés en ayant recours à la synthèse enzymatique. Les dérivés *O*-méthylés ne sont pas donneurs et se sont révélés être de mauvais inhibiteurs de

l'enzyme ppGalNAc-T1. Le dérivé 3 OMe montre une inhibition comparable à celle de l'UDP-GlcNAc.

Référence	Modification	Rdmt (%)	Méthode	Ki (µM)	IC50 (µM)
Busca <i>et al.</i> , 2003	C3-OMe	16	chimique	-	300
	C4-OMe	9		-	750
	C6-OMe	5		-	750
Hang <i>et al.</i> , 2004b, figure 12	Analogue 1	65	chimique	7,8	21
	Analogue 2	67		7,8	24
	Analogue 3	a	a	34,3	nd
Feng <i>et al.</i> , 2004	C4-F	18	enzymatique	-	nd
Schäfer et Thiem, 2000	C1 spacer	< 13	chimique	-	nd
Lazarevic et Thiem, 2002	C2-Et	31	chimique (Khorana)	Produits impurs : Reste UPPU	
	C2-Pr	32			
	C2-CH ₂ Br	30			
Hang <i>et al.</i> , 2004a	C2-azido	23	chimique	7,68	nd
Busca et Martin, 2004	C2-CF ₃	29	chimique	200-300	nd

Tableau IV. Rendements de synthèse et évaluation biologique des dérivés analogues d'UDP-GalNAc. a. vendu par SIGMA-ALDRICH, méthode et rendement de synthèse non indiqués.

Ces résultats indiquent que les positions aux carbones 3, 4 et 6 ne permettent pas l'introduction de groupements volumineux ou encore que les groupements hydroxyles sont nécessaires à la reconnaissance du substrat par la formation de liaisons hydrogènes. Plus particulièrement le OH en C-4 et le groupement *N*-Acétyle doivent être fortement impliqués dans la reconnaissance puisque ni l'UDP-GlcNAc, ni l'UDP-Gal ne sont reconnus comme substrats (Wandall *et al.*, 1997).

Des résultats préliminaires concernant la *O*-glycosylation ont pu être obtenus avec la molécule inhibitrice 1 de la figure 12 (Hang *et al.*, 2004b) : des lignées cellulaires de fibroblaste d'embryon de souris incubées en présence de l'inhibiteur montrent que la *O*-glycosylation à la surface cellulaire est considérablement réduite, et qu'un phénomène d'apoptose apparaît rapidement. Une surexpression de différentes ppGalNAc-Ts restaure la *O*-glycosylation de surface et empêche l'apoptose. Une culture d'organes (mandibules de l'embryon) en présence de l'inhibiteur conduit à des malformations. Tout ceci suggère que la *O*-glycosylation de type mucine est nécessaire au développement et que les ppGalNAc-Ts jouent un rôle dans la régulation de l'apoptose (Tian *et al.*, 2004). D'autres études d'inhibition de la *O*-glycosylation ont été réalisées avec des molécules dont la structure est plus éloignée

de celle de l'UDP-GalNAc. Par exemple, le composé GalNAc-*O*-Bn et ses dérivés sont de bons inhibiteurs compétitifs de la liaison glycosidique GalNAc-*O*-Ser/Thr. Contrairement à ce que l'on aurait pu attendre, ces dérivés n'agissent pas en tant qu'inhibiteurs de l'addition des résidus GalNAc aux Ser et Thr mais ils sont de véritables inhibiteurs de la glycosylation périphérique et particulièrement de l'élongation de l'antigène T (Gal β 1-3GalNAc). Les résultats ont montré que dans certaines lignées, on observait une accumulation de complexes oligosaccharidiques contenant le monosaccharide GalNAc-*O*-Bn. Ces informations ont pu mettre en évidence le rôle des *O*-glycanes notamment dans la sécrétion des mucines et dans le mécanisme d'action des enzymes lysosomiales.

Les molécules inhibitrices analogues d'UDP-GalNAc pourraient également être utilisées *in vitro* en présence de ppGalNAc-Ts pour réaliser de la STD-NMR. Cette technique permet de déterminer de manière qualitative les groupements fonctionnels du substrat qui sont en interaction directe avec le site actif de la protéine. Cette méthode a été par exemple employée pour déterminer la conformation adoptée par l'UDP-Gal dans le site actif de l'enzyme β -1,4-Galactosyltransférase (Biet et Peters, 2001, Jayalakshmi *et al.*, 2004).

Pour conclure, l'utilisation d'inhibiteurs de la *O*-glycosylation permet d'obtenir bon nombre d'informations sur les conséquences d'une aberration dans la glycosylation. Elle permet également de préciser les interactions « substrat-protéine » ce qui pourra mener à long terme à l'élucidation du mécanisme de transfert de GalNAc. Néanmoins cet outil ne permet pas la caractérisation des voies normales de biosynthèse. Par contre, l'idée de présenter à la cellule une molécule voisine de l'UDP-GalNAc et dont le monosaccharide modifié pourrait être incorporé aux protéines de la même manière que le serait le GalNAc, serait un moyen de caractériser les voies de synthèse empruntées *in vivo*.

III.2. Recherche d'un donneur

Afin d'étudier plus en détail les glycoprotéines de type mucine, une méthode de marquage covalent de ces protéines spécifiques a été développée (Hang *et al.*, 2003). Cette méthode repose sur l'utilisation d'un analogue de GalNAc, le GalNAz qui une fois incorporé dans les cellules est naturellement métabolisé, empruntant les mêmes voies biosynthétiques que le sucre naturel. Les études ont montré que cet analogue était pris en charge par les ppGalNAc-Ts lors de la glycosylation de type mucine. L'avantage d'un tel substrat est la facilité de marquage via la ligation de Staudinger (figure 15, Saxon et Bertozzi, 2000).

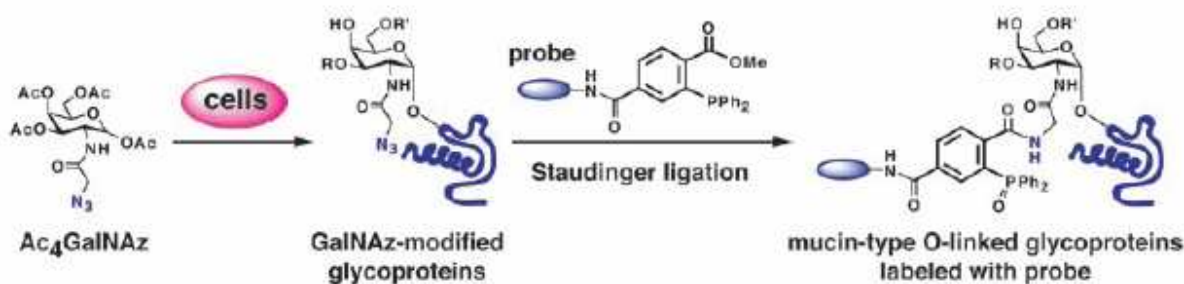


Figure 15. Incorporation et repérage du GalNAz (Saxon et Bertozzi, 2000).

Les glycoprotéines portant la fonction azido (GalNAz) réagissent avec une phosphine portant un Tag (FLAG). Ce dernier est reconnu par un anticorps anti-FLAG porteur de l'enzyme HRP (figure 16). Cette dernière enzyme catalyse la conversion du substrat ABTS en un produit coloré dont le maximum d'absorption se situe à 450 nm. La mesure de l'absorption à cette longueur d'onde est directement proportionnelle au nombre de GalNAz transférés.

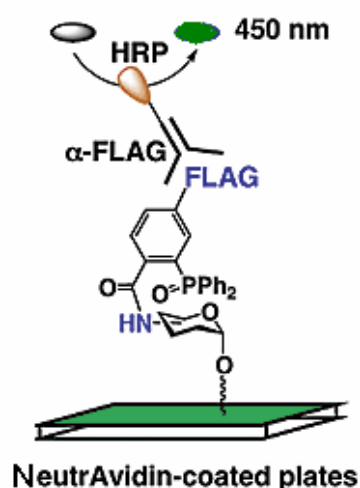


Figure 16. Détection du GalNAz : couplage à la phosphine et repérage du Tag FLAG par l'enzyme HRP.

Cette méthode a permis la détection de glycoprotéines de type mucine dans une étude chez la souris. Les glycoprotéines marquées ont pu être repérées dans un grand nombre de tissus comme le foie, les reins, le cœur, dans le sérum et sur des splénocytes isolés. Les glycoprotéines des cellules B ont pu être marquées de manière intense ce qui ne fut pas le cas pour les cellules T suggérant une différence dans le processus de glycosylation. En outre, les cellules B ont pu être sélectivement ciblées avec la sonde phosphine ce qui est prometteur pour l'identification future de glycoprotéines à O-glycanes qui seraient associées à certaines maladies (Dube *et al.*, 2006).

L'utilisation de monosaccharides modifiés s'avère donc très utile pour le ciblage de cellules malignes. D'autre part, le Neu5Gc n'est pas un sucre modifié mais il joue le même rôle dans le sens où les humains ne peuvent pas produire cette molécule et le reconnaissent comme du non-soi. Il a été montré que ce sucre exogène apporté sous forme de glycoconjugués par l'alimentation (protéines animales) atteint les lysosomes via le chemin pinocytique/endocytique et qu'il est relargué sous sa forme libre dans le cytosol où il est alors disponible pour être incorporé aux protéines. L'avantage est que les cellules malignes et les cellules T incorporent ce sucre beaucoup plus rapidement que les cellules saines faisant des

glycoprotéines portant le Neu5Gc de véritables marqueurs de la malignité des cellules. La production d'anticorps consécutive à l'incorporation de Neu5Gc permet de tuer sélectivement les cellules malades (Bardor *et al.*, 2005, Nguyen *et al.*, 2005). Un autre travail tout aussi remarquable utilise un analogue du monosaccharide ManNAc portant une fonction thiol qui se transforme dans les cellules en analogue d'acide sialique portant une fonction thiol. En incorporant ce sucre modifié aux protéines membranaires de cellules, leurs propriétés d'adhésion ainsi que leur morphologie s'en trouvent modifiées (Sampathkumar *et al.*, 2006).

Les analogues de monosaccharides constituent de nouveaux outils pour étudier le rôle des glycanes et contrôler les événements intra et extra-cellulaires. Une autre stratégie pour étudier la *O*-glycosylation consiste à produire des glycopeptides synthétiques. Ils sont d'une part plus facile à manier et sont restreints à une partie peptidique minimale ce qui permet d'étudier le rôle de la chaîne glycanique en s'affranchissant des effets dus à la glycoprotéine entière.

III.3. Utilisation de glycopeptides synthétiques

Les glycopeptides synthétiques facilitent la caractérisation des enzymes et sont des outils très utiles pour étudier les interactions protéine-carbohydate (Grogan *et al.*, 2002). Ils facilitent par exemple la détermination de la spécificité de substrats des ppGalNAc-Ts ainsi que la localisation des sites glycosylés (Goletz *et al.*, 1997). Ils peuvent également servir de source d'antigènes pour le système immunitaire (Hanisch *et al.*, 2003) : une variété d'antigènes associés aux tumeurs sont des *O*-glycanes (Brockhausen, 1999) et les *O*-glycopeptides synthétiques de type mucine constituent des outils potentiels pour des vaccins antitumoraux (Sames *et al.*, 1997, Danishefsky et Allen, 2000).

Nous venons de voir les différentes approches développées pour étudier la *O*-glycosylation. Cela passe par la synthèse de mimes glucidiques qu'il s'agisse de glycopeptides, de polysaccharides, ou bien de sondes (transférables ou non) de glycoenzymes impliquées dans la biosynthèse des glycoconjugués. La synthèse de ces mimes est une étape limitante à l'étude fonctionnelle des glycoconjugués.

IV. SYNTHÈSE DE MIMES GLYCANIQUES

La difficulté majeure est d'obtenir des produits qui soient homogènes. Les glycoconjugués sont exprimés naturellement sous forme d'un mélange de glycoformes. Dans le cas des glycoprotéines, ces glycoformes possèdent le même squelette peptidique mais la nature et la position des chaînes glycaniques diffèrent. La complexité et la grande hétérogénéité des glycoconjugués ne permet donc pas leur extraction à partir de sources naturelles. Plusieurs méthodologies ont été développées pour synthétiser ces composés glucidiques en quantités suffisantes pour mener à bien des études biophysiques et biochimiques. Pendant plus d'une trentaine d'années, la voie chimique s'est imposée et il faut reconnaître que les avancées réalisées au cours du dernier siècle ont été prodigieuses. Mais plus récemment, la simplicité d'utilisation des enzymes a fait de la synthèse enzymatique, une méthode de choix pour la production de glycoconjugués (Hanson *et al.*, 2004, Guo et Shao, 2005, Murata et Usui, 2006).

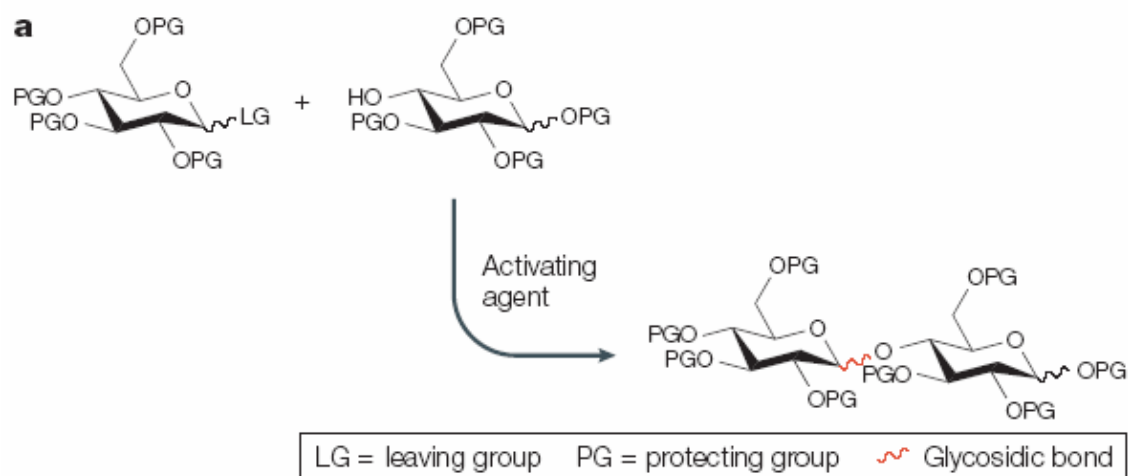
IV.1. Synthèse par voie chimique

IV.1.1. Synthèse des polysaccharides

Nous avons vu que les oligosaccharides se caractérisent par des motifs branchés. Chaque monosaccharide possède plusieurs sites d'attachement possibles et la liaison glycosidique entre deux unités saccharidiques peut prendre deux configurations. Ceci donne lieu à toutes sortes de combinaisons possibles et bien que de réels progrès aient été réalisés dans la synthèse oligosaccharidique, certaines liaisons sont difficiles à reconstituer.

La réaction de glycosylation consiste à former un acétal en condensant deux sucres avec une perte d'eau. La protection des groupements hydroxyles est un challenge dans la synthèse oligosaccharidique. Des groupements protecteurs très résistants, comme les éthers benzyliques sont installés sur les positions où un hydroxyle libre devra figurer dans la molécule finale déprotégée. En revanche, des groupements esters dont la déprotection est aisée sont utilisés pour masquer les hydroxyles qui seront exposés à un certain stade de la synthèse. Le groupement hydroxyle libéré peut ensuite réagir comme nucléophile sur l'autre partenaire saccharidique contenant un groupe partant à la position même où le lien glycosidique est souhaité. La figure 17 schématise la réaction de glycosylation et donne

quelques exemples de groupes partants couramment utilisés pour la synthèse oligosaccharidique.



b Examples of leaving groups



Figure 17. Réaction de glycosylation et exemple de différents groupes partants possibles pour cette réaction, adapté de Seeberger et Werz, 2005.

La formation de cette liaison résulte en deux formes stéréoisomériques (α et β) dont la proportion est contrôlée par les effets stériques et le choix des conditions de réaction (solvant, température...) (Seeberger et Werz, 2005). Les méthodes de contrôle actuelles de la stéréochimie du centre anomérique reposent sur la participation d'une fonctionnalité sur le C2 comme un groupe protecteur ester. La formation d'un ion oxonium intermédiaire protège une des faces de la molécule conduisant ainsi exclusivement à la formation de liens trans-glycosidiques. Les liaisons cis-glycosidiques sont plus difficiles à construire de manière spécifique car il n'y a pas de méthode équivalente applicable.

En 1971, la synthèse oligosaccharidique sur phase solide a fait sa première apparition (Frechet et Schuerch, 1971). L'utilisation de réactifs en excès permet de rendre la réaction complète, le lavage aisé de la résine permet d'éliminer rapidement les impuretés et une seule étape de purification est nécessaire après que l'oligosaccharide soit clivé du support. Conscients des avantages procurés par cette méthode de synthèse, les scientifiques ont rapidement cherché avec succès à automatiser le processus (Kanemitsu et Kanie, 2002). De telles méthodes de synthèses sont également applicables à la synthèse de glycopeptides.

IV.1.2. Synthèse des glycopeptides

Dans ce chapitre, nous pourrions traiter aussi bien de la synthèse des *N*-glycanes que des *O*-glycanes. Cependant, étant donné que le projet de thèse est orienté sur la *O*-glycosylation, nous décrirons dans cette partie uniquement les méthodes relatives à la synthèse des *O*-glycopeptides. L'un des développements les plus remarquables concernant la chimie des peptides est la synthèse sur support solide (SPPS) introduite par Merrifield (Merrifield, 1963). Le développement de nouvelles résines, de nouveaux agents de couplages et de nouveaux groupes protecteurs ont augmenté l'efficacité de la SPPS. Cependant, celle-ci reste dans la plupart des cas limitée à des peptides d'une cinquantaine de résidus. L'étape délicate dans la synthèse chimique d'un glycopeptide est l'introduction du résidu glucidique. Deux stratégies de synthèses chimiques ont été développées comme illustré figure 18.

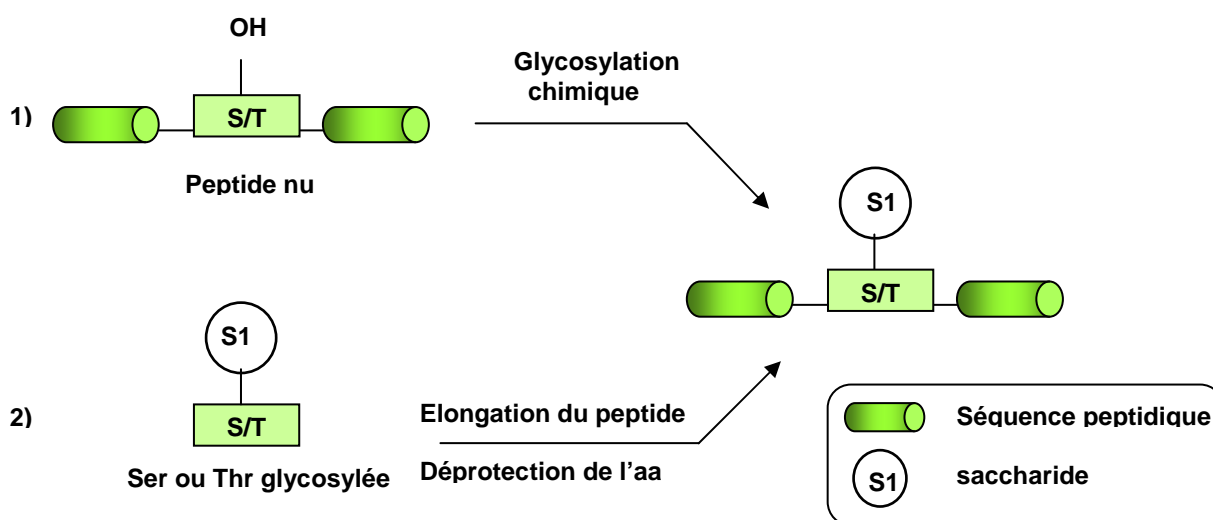


Figure 18. Schématisation des deux méthodes de synthèse des glycoconjugués.

La première méthode consiste à assembler le peptide puis dans un second temps à le glycosyler par voie chimique ou enzymatique. Cependant, la glycosylation chimique n'est que très rarement usitée du fait de la difficulté d'obtenir une liaison *O*-glycosidique qui soit stéréosélective. L'utilisation d'enzymes est préconisée dans ce cas et ces outils biologiques particulièrement bien adaptés à la formation de liaisons spécifiques feront l'objet de la prochaine partie.

La seconde approche repose sur une glycosylation préalable des Ser et Thr. Les « building blocks » ainsi obtenus sont dans la majorité des cas protégés puis incorporés au squelette peptidique lors de son élongation. Pour cette méthode, l'étape limitante est la préparation du synthon glycosylé. Dans le cas de glycopeptides de type mucine, le premier monomère

saccharidique fixé sur les résidus est le GalNAc. Le synthon le plus simple nécessaire à la synthèse de tels glycopeptides est donc le synthon Ser/Thr- α -GalNAc protégé (Arsequell et Valencia, 1997, Herzner *et al.*, 2000). La méthode couramment utilisée pour la formation de la liaison α -O-glycosidique du synthon Ser/Thr- α -GalNAc est celle développée par Paulsen et ses collaborateurs (Paulsen *et al.*, 1995). Ceux-ci ont introduit l'utilisation de donneurs de glycosyles, tels que les halogénures de glycosyles, possédant une fonction azido (N_3) non participante en position 2, permettant la formation majoritaire de la liaison α . Ce composé, facilement accessible par une réaction d'azidonitration (Lemieux et Ratcliffe, 1979) a permis la glycosylation d'une thréonine et d'une sérine protégées (Schéma 1). Deux voies différentes de synthèse (A et B) ont été comparées à partir des produits issus de l'azidonitration (Liu *et al.*, 2005b). La méthode A est sans conteste celle à privilégier puisque les synthons 13 (Ser glycosylée) et 14 (Thr glycosylée) sont obtenus en trois étapes avec des rendements doubles (voire triples pour la sérine) de ceux obtenus par la voie B.

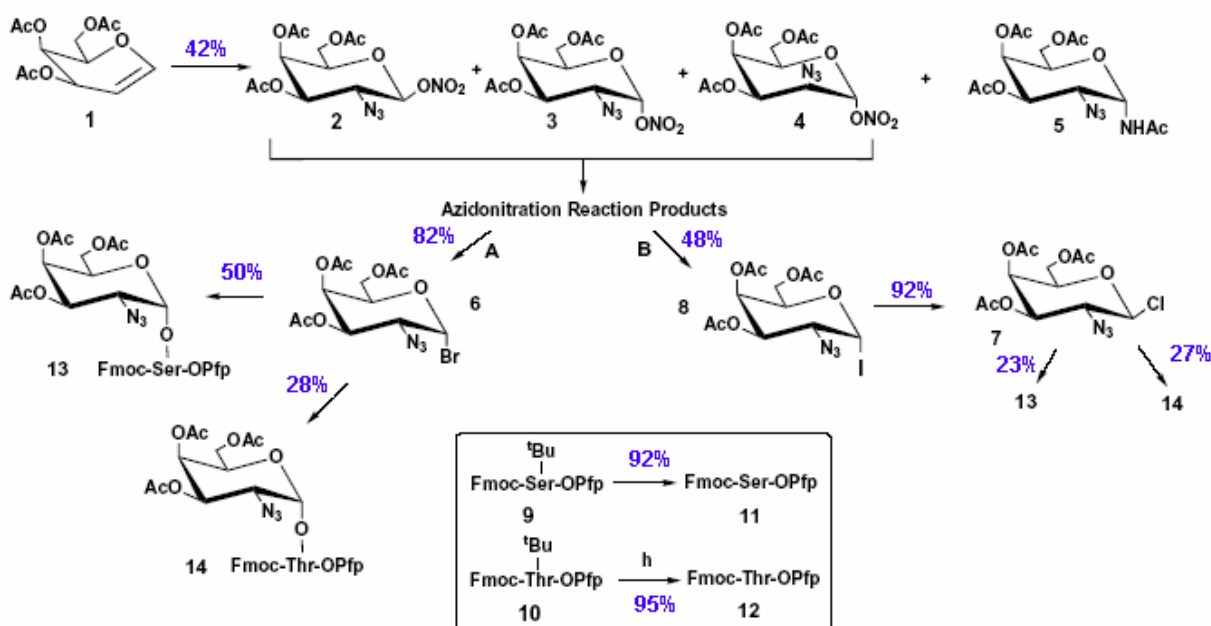


Schéma 1. Glycosylation de sérine et thréonine via deux méthodes A et B, d'après Liu *et al.*, 2005b.

Néanmoins, les rendements globaux restent faibles 18% pour la sérine et 10% pour la thréonine ce qui fait de la préparation du synthon glycosylé, l'étape limitante dans la synthèse de glycopeptides d'autant plus que l'unité saccharidique doit encore être réduite puis acétylée pour obtenir la fonction acétamido (AcNH).

Une fois que le synthon glycosylé est préparé, il ne reste plus qu'à enchaîner les aminoacides pour obtenir le peptide final glycosylé. Etant donnée l'efficacité de la synthèse en solution, la stratégie visant à utiliser des synthons Thr/Ser- α -GalNAc pour la synthèse de glycopeptides a

été plus tard appliquée en phase solide dont les avantages pour la synthèse de peptides sont bien connus. Là encore le challenge de la chimie organique réside dans la déprotection du sucre. Le lien glycosidique est labile en conditions acides (Kunz et Unversagt, 1988) et il faut donc bien choisir le groupement protecteur pour ne pas avoir à utiliser des conditions trop drastiques pour le retirer. De même, lors de conditions basiques trop fortes, il peut y avoir β -élimination du sucre (Sjolin *et al.*, 1996). La synthèse de *O*-glycanes de type mucine, est généralement réalisée sur phase solide avec protection Fmoc/tBu. Durant l'élongation, les fonctions alcools du glycosyle sont protégées sous forme d'ester par des fonctions acétyles. Le synthon Fmoc-Thr/Ser(α -Ac₄GalNAc)-OH est préparé selon le principe précédent, il est aujourd'hui commercialisé mais à des prix prohibitifs. Le 7-mer Ac-Pro-[Thr(α -D-GalNAc)]₃-Pro-Leu-Lys-NH₂ a récemment été synthétisé par cette méthode et le schéma de synthèse est exposé figure 19 (Liu *et al.*, 2005a).

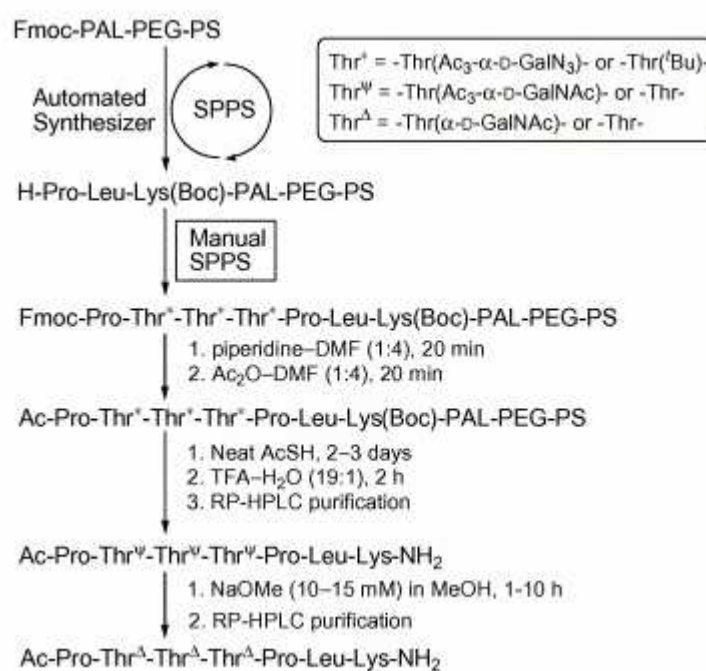


Figure 19. Processus de synthèse d'un peptide par voie chimique (Liu *et al.*, 2005a).

On y voit notamment le nombre considérable d'étapes nécessaires à l'obtention du glycopeptide et ceci illustre bien la complexité de la synthèse chimique même lorsqu'il s'agit de travailler avec des monosaccharides. Un rendement de 7% (soit 8 mg de produit récupéré) a été calculé par rapport à la substitution initiale de la résine, mais ceci est sans compter le faible rendement de préparation de la thréonine glycosylée.

L'avantage de la synthèse chimique est l'obtention de glycopeptides qui soient bien définis et homogènes. Néanmoins, il s'agit d'une synthèse délicate. Seules les réactions de ligation chimique qui présentent l'avantage d'être réalisées dans des conditions douces et sélectives

semblent compatibles avec la polyfonctionnalité des peptides et des saccharides. Plusieurs méthodes ont été développées pour utiliser la ligation chimique pour la synthèse de glycopeptides (Buskas, 2006). Celles-ci consistent soit à fixer des mono-/oligo-saccharides sur un peptide ou un glycopeptide (Peri et Nicotra, 2004), soit à assembler deux glycopeptides afin d'obtenir une glycoprotéine de taille plus importante. Dans les deux cas, la ligation chimique nécessite la fonctionnalisation des deux partenaires par deux groupes fonctionnels spécifiquement réactifs. La ligation la plus simple est réalisée entre un thioester (accepteur du groupement acyle) et une cystéine en position N-ter de la protéine. Le mécanisme débute par une réaction de *trans*-thioestérification entre les deux partenaires, immédiatement suivie d'un réarrangement spontané irréversible conduisant à la liaison amide native. La difficulté est de synthétiser des glycopeptides présentant une fonction thioester en N-ter. La stratégie Fmoc qui est la méthode de choix pour la synthèse chimique de glycopeptides requiert une déprotection en conditions basiques non compatibles avec la liaison thioester. La difficulté a été contournée avec le développement de bras comme les sulfonamides qui permettent l'assemblage du glycopeptide thioester par la technique standard au Fmoc. Le glycopeptide fonctionnalisé est récupéré après un processus de clivage de la résine en deux étapes. Cependant, l'assemblage peptidique réalisé par SPPS limite la taille du glycopeptide thioester utilisé pour la ligation et par conséquent la taille de la protéine résultante. Une autre méthode appelée "Expressed Protein Ligation" permet d'obtenir des glycopeptides α -thioester recombinants possédant un grand nombre de résidus. Cette méthode biochimique a été utilisée au sein de mon équipe pour synthétiser un peptide substrat du bioréacteur que j'ai développé et fera donc l'objet d'une description plus détaillée dans une autre partie de ce manuscrit. Afin de pouvoir préparer des protéines de taille importante, il est également possible de réaliser des ligations chimiques natives en tandem en protégeant le thiol de la cystéine en N-ter avec un groupement orthogonal. Le problème de la ligation thioester/cystéine est que le résidu cystéine est assez peu répandu (1.7 % de tous les résidus protéiques) et qu'il est très rare d'obtenir des protéines possédant ce résidu en N-ter (Liu *et al.*, 2006a). Ainsi, d'autres groupements fonctionnels ont été utilisés pour la ligation. Par exemple, la ligation de Staudinger dans laquelle un azide et un phosphinothioester réagissent pour former un amide permet de coupler de manière très « propre » et avec des rendements élevés divers peptides ou glycopeptides (Liu *et al.*, 2006b). Mais cette méthode n'évite pas l'étape de synthèse préalable de la thréonine glycosylée. C'est pourquoi une autre voie s'impose, qui utilise des enzymes pour effectuer cette étape de synthèse. Néanmoins pour l'utiliser, il faut disposer des nucléotides-sucres, substrats donneurs de glycosyle. Le prochain chapitre vise à décrire les différentes méthodes pour obtenir ces précurseurs.

IV.1.3. Synthèse de nucléotides-sucres

L'étude structurale et fonctionnelle des glycanes passe par une connaissance précise des voies de biosynthèse et des glycoenzymes impliquées. L'étude de la spécificité des enzymes et de leur mécanisme peut s'effectuer *in vitro* à la condition de disposer des substrats naturels ou éventuellement d'analogues en quantité appropriée. Pour étudier les enzymes de type Leloir, il s'agit de produire de manière synthétique les UDP-sucres qui sont donneurs de monosaccharide durant la réaction de glycosylation. Le fait est que là encore la synthèse chimique de ces petites molécules est freinée par un besoin de protection/déprotection et de régiosélectivité qui rendent la production de ces composés complexe et surtout coûteuse.

Deux méthodes sont couramment utilisées. La première consiste à faire réagir un diphospho-nucléotide commercial sur un monosaccharide convenablement activé en position anomérique. Ce processus dit de glycosylation directe n'est cependant pas le plus efficace, conduisant avec de faibles rendements à un mélange d'anomères α/β inséparables par les techniques classiques (Uchiyama et Hindsgaul, 1998). La seconde méthode implique la formation du pont pyrophosphate central par couplage entre un sucre-1-P et un monophospho-nucléotide commercial (Moffat et Khorana, 1958, Lazarevic et Thiem, 2002). Elle est notamment employée pour la synthèse de nucléotides-sucres de configuration α (schéma 2). L'étape préliminaire consiste à préparer le synthon sucre-1-P. En 1982, Shiba propose une procédure applicable à tous les types de sucre et compatible avec un grand nombre de groupements protecteurs. Cette procédure repose sur l'attaque de l'oxygène anomérique sur un phosphate activé comme le chlorure de dibenzyl phosphate. Il suffit ensuite de réaliser le couplage avec le monophospho-nucléotide commercial préalablement activé sous forme de phosphomorpholide (Roseman *et al.*, 1961).

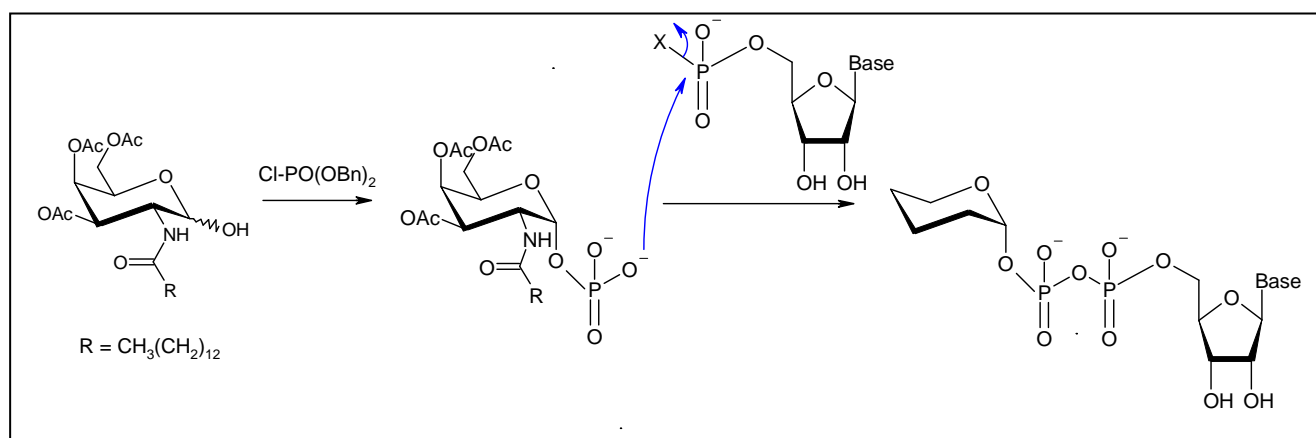


Schéma 2. Méthode classique de synthèse d'un UDP-sucre par voie chimique

Même si les rendements de couplage sont satisfaisants, l'obtention de l'UDP-sucre en quantité importante est compromise par l'étape de purification du produit. Il faut pouvoir se débarrasser d'un nombre important de sous-produits à savoir le sucre-1-P qui n'a pas réagi, l'UMP-morpholidate sous sa forme d'origine et sous sa forme hydrolysée UMP et l'UPPU qui est le produit d'homo-couplage.

Dans l'ensemble, les faibles rendements alliés à la difficulté de synthèse ne font pas de la voie chimique un outil de choix pour la production économique de complexes glucidiques. Face au manque de méthodes directes pour accéder à des glycoconjugués et molécules glucidiques d'intérêt biologique, la synthèse chimio-enzymatique s'est révélée comme alternative éludant les problèmes de stéréochimie et de protections sélectives.

IV.2. Synthèse enzymatique

L'approche enzymatique consistant à glycosyler par réaction enzymatique le peptide ou les oligosaccharides déjà formés est une alternative permettant de s'affranchir des difficultés liées à la stéréosélectivité des liaisons glycosidiques formées et au grand nombre de fonctionnalités présentes sur les unités saccharidiques (Song *et al.*, 2006).

IV.2.1. Glycosylation enzymatique d'oligosaccharides, de peptides et de protéines

Dans la partie I, nous avons vu que les enzymes responsables de la biocatalyse de la liaison glycosidique sont les glycosyltransférases. L'évolution des techniques permet aujourd'hui de cloner ces enzymes et de reproduire les réactions de biosynthèse *in vitro*. Il est alors possible de glycosyler par voie enzymatique un peptide assemblé par voie chimique. Contrairement à la synthèse chimique, cette méthode utilise des enzymes très spécifiques qui produisent le lien glycosidique dans la configuration attendue (α ou β) et dont les rendements élevés de bioconversion facilitent la purification des produits. Ceci permet aujourd'hui de produire rapidement des molécules naturelles ou des mimes synthétiques afin d'étudier plus précisément le rôle biologique de certaines structures ou encore de les utiliser à des fins thérapeutiques.

La liaison thioglycosidique est par exemple un mime très intéressant de la liaison *O*-glycosidique puisqu'elle adopte une conformation spatiale très similaire et présente l'avantage d'être beaucoup moins sensible à l'hydrolyse par les glycosylhydrolases. Alors que la synthèse chimique de ces molécules s'avère être périlleuse, une méthode enzymatique permet de manière quasi-quantitative de synthétiser les thiooligosaccharides (Rich *et al.*, 2004).

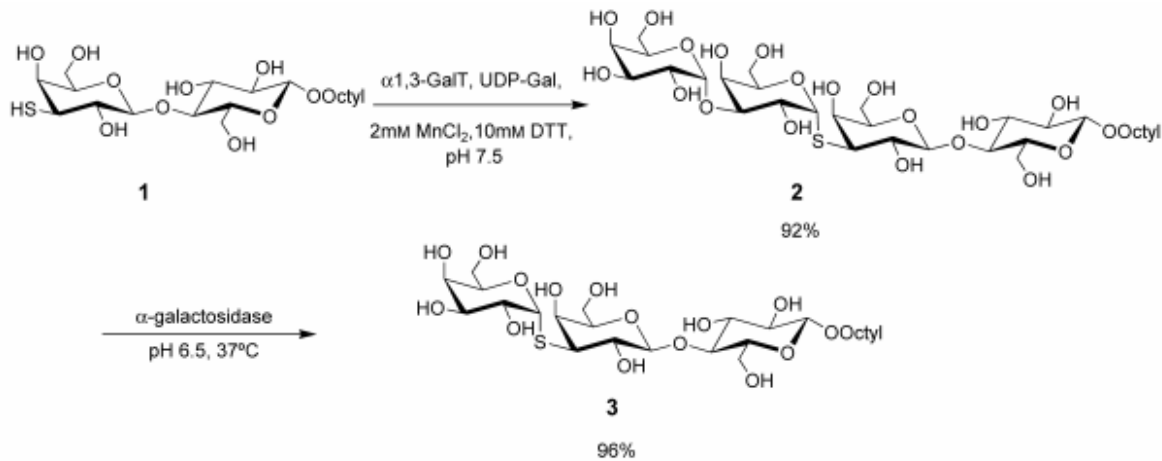


Figure 20. Synthèse enzymatique du thiotétraccharide 2 par l'enzyme α 1,3-Galactosyltransferase et hydrolyse sélective du lien O-glycosydique terminal par l'enzyme α -galactosidase pour conduire au thiotrisaccharide 3.

Cette approche emploie une glycosyltransférase pour catalyser le transfert du résidu Gal, à partir du substrat UDP-Gal, sur des substrats glycosidiques porteurs de thiols (figure 20). Outre les nombreux bénéfices apportés par l'emploi d'enzymes, cette méthode permet l'utilisation d'un agent réducteur dans le mélange réactionnel qui empêche la formation de ponts disulfures et évite ainsi la perte de matériel lors de la synthèse.

L'équipe de Clausen (Sorensen *et al.*, 2006) a combiné l'action de plusieurs de ces transférases *in vitro* pour introduire des motifs Tn et STn sur le peptide (MUC1)₅ (figure 14) à partir d'UDP-GalNAc commercial.

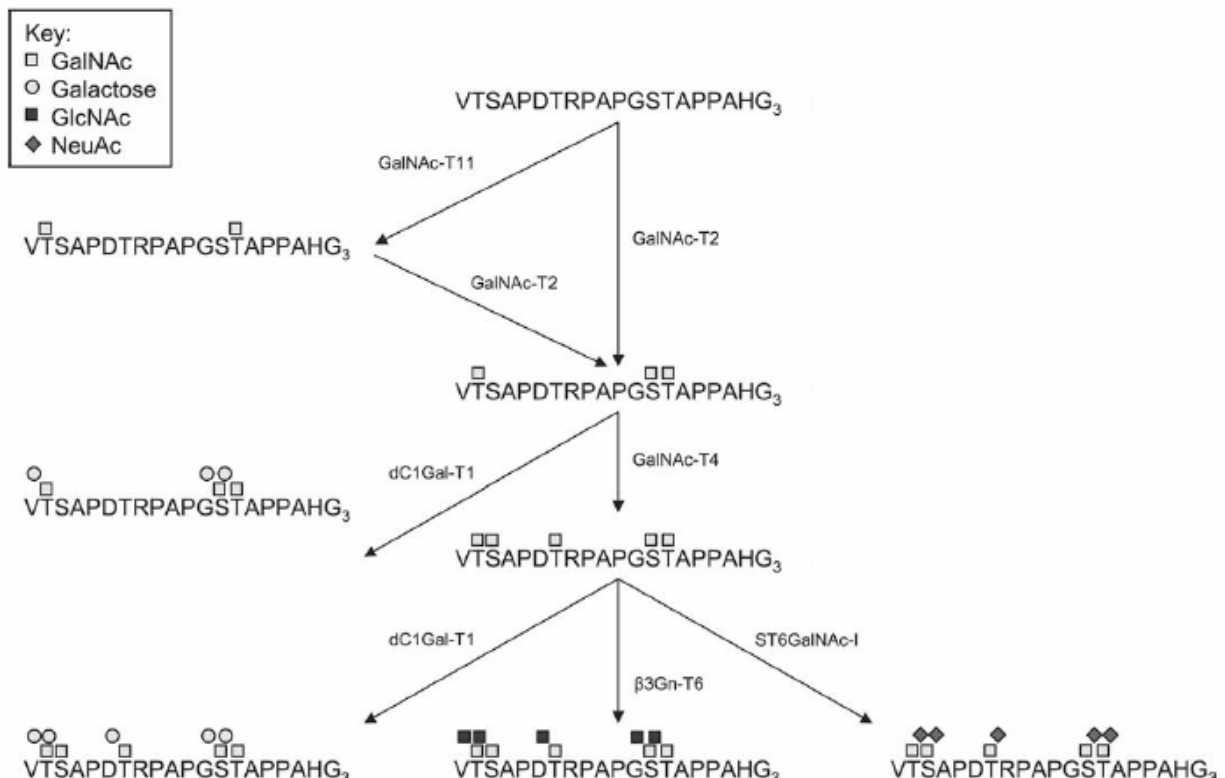


Schéma 3. Incorporation enzymatique de divers sucres sur un peptide accepteur (Sorensen *et al.*, 2006).

L'introduction des saccharides GalNAc et NeuAc avec des rendements respectifs de 85% et 70% permet d'obtenir les glycopeptides avec un taux de recouvrement satisfaisant (Schéma 3). Certains de ces composés ont été évalués *in vivo* pour l'élaboration d'un vaccin contre le cancer du sein. Les produits possédant le maximum de sites glycosylés induisent la plus forte réponse humorale contre MUC1 exprimé dans des lignées cellulaires de cancer du sein issues à la fois de souris Balb/c et de souris transgéniques pour MUC1. Malheureusement les faibles quantités de glycoconjugués produites n'ont permis de réaliser l'étude que sur 5 souris injectées avec une très faible quantité de produit (10 µg par souris) démontrant la limite de la glycosylation enzymatique à partir d'UDP-GalNAc commercial.

Une autre approche a été employée pour la synthèse *in vivo* de néoglycoprotéines et glycoprotéines (Wang et Schultz, 2005). Elle repose sur l'utilisation d'une enzyme ARNt synthétase issue de *Methanococcus jannaschii* capable d'accepter et de transférer des aminoacides modifiés lors de la biosynthèse de la protéine (figure 21). Cette nouvelle voie de synthèse originale a permis l'introduction de Thr glycosylées à une protéine. Avec un taux de production avoisinant les 4mg/L, cette méthode pourrait conduire à la production par fermentation de glycoprotéines possédant des unités saccharidiques bien définies et dont le positionnement serait contrôlé de manière génétique.

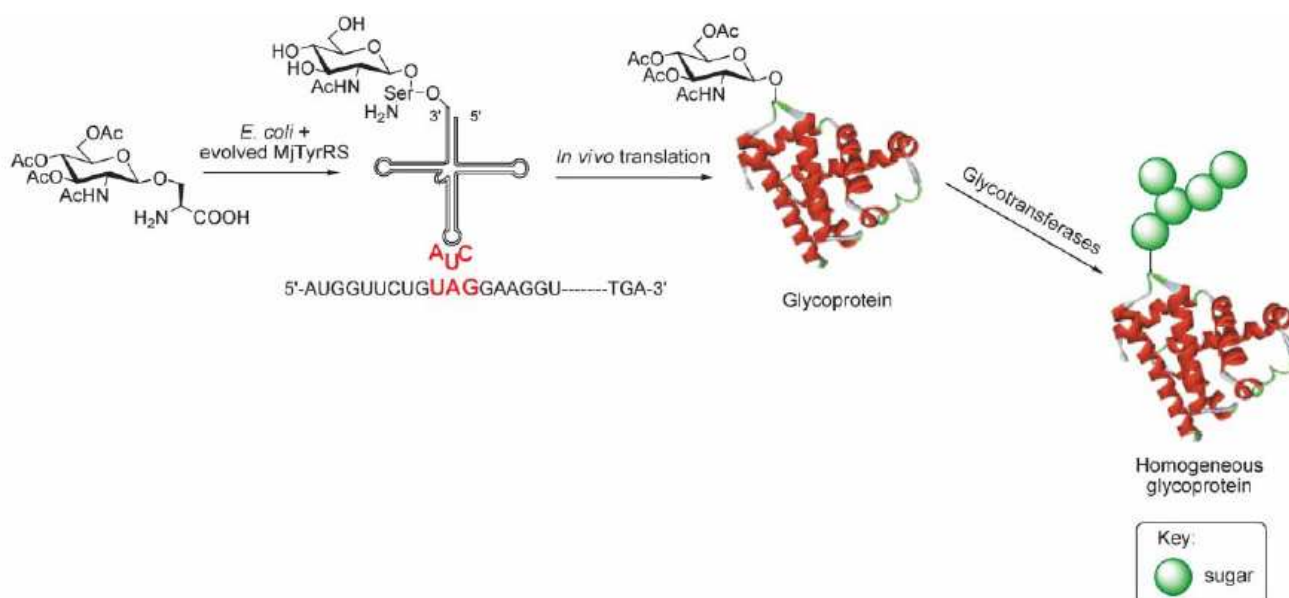


Figure 21. synthèse *in vivo* de glycoprotéines et néoglycoprotéines catalysée par l'enzyme ARNT synthétase issue de *Methanococcus jannaschii* (Wang et Schultz, 2005).

Cette méthode permet également d'envisager l'introduction d'acides aminés non naturels ou encore d'unités saccharidiques modifiées, dont l'intérêt a été discuté précédemment, à la condition que le matériel puisse pénétrer dans la bactérie sans dommage pour le système et que les produits modifiés soient transférables par l'enzyme MjTyrRS. Cependant, cette

méthode concerne uniquement l'addition de la première unité saccharidique sur la protéine et si l'on souhaite disposer d'une chaîne oligosaccharidique à plusieurs maillons, il faut avoir recours à la catalyse enzymatique classique par les différentes glycosyltransférases.

En outre, la glycosylation d'une protéine est une modification post-traductionnelle qui a donc lieu sur la chaîne peptidique déjà repliée. Dans la voie de synthèse décrite ici, les unités saccharidiques sont introduites avant le repliement et il n'est pas du tout évident que dans un système procaryotique comme la bactérie, la protéine puisse se replier correctement.

Tous ces exemples sur l'emploi de la chimie enzymatique montrent que c'est une alternative de choix pour la synthèse glucidique comme en témoignent les rendements de glycosylation et de plus en plus, elle offre de nouvelles possibilités pour la production de molécules non-naturelles. Cependant, les précurseurs de monosaccharides sont parfois difficiles à obtenir. Plus particulièrement, la conformation galacto- pose toujours plus de difficultés dans la stéréochimie que la structure gluco- et dans le prochain paragraphe, nous nous attacherons à décrire les méthodes actuelles de synthèse enzymatique du nucléotide sucre UDP-GalNAc.

IV.2.2. Synthèse du précurseur UDP-GalNAc

Différentes méthodes enzymatiques ont été développées pour tenter d'améliorer les rendements de synthèse de l'UDP-GalNAc. Dans les organismes vivants, diverses voies de biosynthèse permettent d'obtenir ce produit. De manière générale, l'UDP-GlcNAc est transformé en UDP-GalNAc par une épimérase (Piller *et al.*, 1983). Chez les mammifères il existe aussi une voie où le GalNAc de source alimentaire est transformé en GalNAc-1-P par une GalNAc kinase, puis en UDP-GalNAc par une UDP-GalNAc pyrophosphorylase (Pastuszak *et al.*, 1996a). L'UDP-GalNAc peut aussi être formé en utilisant les voies enzymatiques que l'on connaît *in vivo*. Ainsi l'épimérase est l'enzyme la plus couramment utilisée (Piller *et al.*, 1982). L'inconvénient majeur de cette méthode est que le rendement de la réaction ne peut dépasser 30% à l'équilibre à cause d'une réversibilité de la réaction favorisée vers la production d'UDP-GlcNAc. En outre, vient s'ajouter la difficulté de séparer l'UDP-GalNAc formé de l'UDP-GlcNAc résiduel (Piller *et al.*, 1982). Une autre voie de synthèse, cette fois chimio-enzymatique, utilise une galactokinase de levure pour transformer la galactosamine en galactosamine-1-P avec un rendement toutefois très faible (Carlson *et al.*, 1964). L'osamine-1-P peut ensuite être couplée à l'UDP par la technique de Moffat et Khorana (Moffat et Khorana, 1958) ou par catalyse de la Gal-1-P uridyltransférase de levure (Heidlas

et al., 1992). L'UDP-GalN ainsi formée doit encore être *N*-acétylée par voie chimique conduisant à un rendement global de synthèse faible. Enfin une autre voie de synthèse chimio-enzymatique a été reportée à partir d'UMP, de sucrose et de galactosamine-1-P, en utilisant une nucléoside monophosphate kinase de foie de boeuf, une sucrose synthase de riz et une Gal-1-P uridyltransférase de levure ainsi que d'autres enzymes qui permettent la régénération de l'UTP et du NAD nécessaires à la réaction. Là encore il y a d'abord formation d'UDP-GalN qui est ensuite *N*-acétylée par voie chimique. Outre la grande quantité d'enzymes et de produits de départ nécessaires pour cette méthode, ce qui la rend très onéreuse, le rendement global est de 34 % après purification (Bulter *et al.*, 2001).

Ainsi, la voie enzymatique ouvre de nouvelles voies de synthèse de l'UDP-GalNAc mais les rendements ne sont pas encore compatibles avec une utilisation de l'UDP-sucrose comme substrat de réactions enzymatiques. Le développement de bioréacteurs avec un système de régénération de l'UDP-sucrose donneur a été une révolution dans la synthèse oligosaccharidique.

IV.2.3. Synthèses oligosaccharidiques avec régénération de l'UDP-sucrose

L'évolution des techniques concernant la synthèse enzymatique consolide notre savoir-faire quant à la production de glycoconjugués. En 1982, Whitesides et son équipe ont mis au point un bioréacteur (figure 2) pour régénérer l'UDP-Gal qu'ils utilisent comme substrat donneur de galactose dans la synthèse de la *N*-acétyllactosamine (Wong *et al.*, 1982). L'UDP formé lors du transfert de sucre est immédiatement pris en charge par une pyruvate kinase qui régénère l'UTP et dans une deuxième étape l'UDP-Gal précurseur.

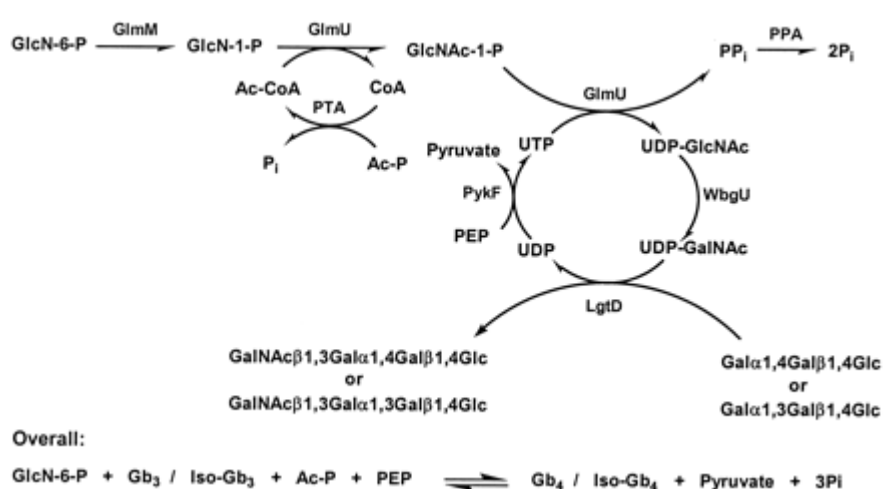


Figure 22. Synthèse chimioenzymatique de tétrasaccharides avec régénération *in situ* de l'UDP-GalNAc (Shao *et al.*, 2002).

Ce système de régénération peut largement s'appliquer à d'autres nucléotides-sucres donneurs et laisse apparaître une stratégie efficace pour la synthèse de glycoconjugués (David *et al.*, 1991). En 1987, la découverte du nickel II comme chélateur de protéines possédant des résidus histidines (Hochuli *et al.*, 1987) permit le développement d'une nouvelle méthode de purification pour les enzymes recombinantes. Ainsi, P.G. Wang et collaborateurs ont mis au point un système de régénération de l'UDP-GalNAc *in vitro* faisant intervenir 8 enzymes possédant une étiquette 6-Histidines pour la synthèse de globotétraose (figure 22) (Shao *et al.*, 2002). L'inconvénient de ce cycle reste néanmoins l'étape d'épimérisation dont l'équilibre est fortement déplacé vers la synthèse d'UDP-GlcNAc. A ce problème vient s'ajouter la difficulté de séparer l'UDP-GalNAc de l'UDP-GlcNAc.

La caractéristique chélatante du nickel envers les résidus His fut plus largement exploitée lorsque l'on tenta d'immobiliser les enzymes sur un gel d'agarose nickel-nitrilotriacétate (Ni-NTA) et d'utiliser directement ce gel lors de la réaction enzymatique (Chen *et al.*, 2001, Liu *et al.*, 2002, Nahalka *et al.*, 2003). L'avantage est d'éviter l'étape de purification des enzymes, d'accroître leur stabilité et de les utiliser en batches multiples (Ivannikova *et al.*, 2003). Les rendements atteints sont de l'ordre de 70%. Bien que le bioréacteur *in vitro* ait été un réel succès, l'idée d'un bioréacteur *in vivo* est encore plus séduisante (Luzhetskyy et Bechthold, 2005). C'est ainsi qu'un cycle de régénération de l'UDP-Gal (figure 23) fut transféré dans la bactérie *E. coli* dans le but de synthétiser à grande échelle divers polysaccharides (Zhang *et al.*, 2003a). Un plasmide contenant tous les gènes d'intérêts dans *E. coli* fut construit pour la synthèse de globotriose (figure 24).

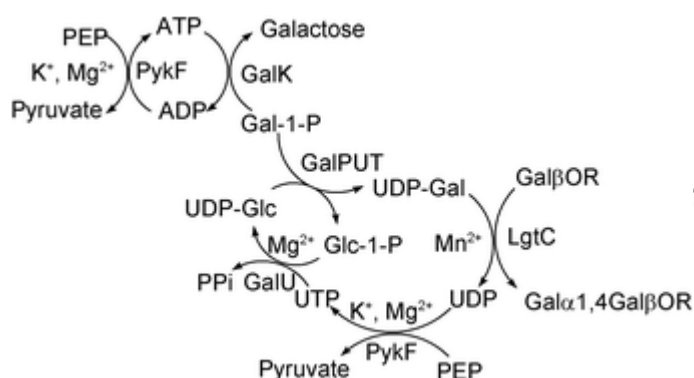


Figure 23. Synthèse chimioenzymatique de Gal α 1,4Gal β OR avec régénération *in situ* de l'UDP-Gal.

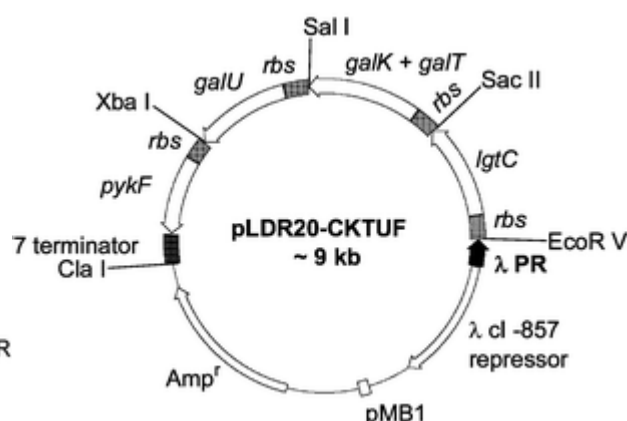


Figure 24. Construction plasmidique contenant les gènes codant pour les protéines du cycle.

Les rendements observés sont de manière générale plus faibles que ceux obtenus dans le cas du système *in vitro*. Cependant, pour certains substrats accepteurs pour lesquels la

glycosylation fonctionnait très mal *in vitro* (5-10%), les rendements sont doublés dans le système *in vivo*. De plus, cette perte au niveau du rendement est compensée par la réduction des coûts de production que peut apporter ce système de « cellule entière ». En effet, *in vitro*, tous les réactifs nécessitent d'être introduits en quantité stœchiométrique alors qu'*in vivo*, une quantité catalytique de ces produits (souvent coûteux) suffit, la majeure partie de l'énergie nécessaire à la glycosylation étant apportée par le métabolisme cellulaire. En outre, ce système garantit une meilleure stabilité des enzymes. Pour que le bioréacteur soit encore plus efficace, il est possible d'immobiliser les cellules entières. C'est ainsi que le nucléotide sucre CMP-NeuAc a été produit à raison de 60-120 g/L de culture dans des cellules *E. coli* piégées dans de l'alginate de calcium. Bien que les rendements soient moins élevés que ceux observés *in vitro*, il est avantageux d'un point de vue économique puisque la synthèse *in vitro* avec les enzymes purifiées à partir d'1 L de culture ne permet pas d'obtenir plus de 8 g de produit (Nahalka *et al.*, 2004). Un cycle de régénération de l'UDP-Gal a également été mis au point dans la levure *Pichia pastoris* dans le but d'améliorer la production du trisaccharide (Gal α 1,3Gal β 1,4Glc) (Shao *et al.*, 2003), l'expression dans la levure permettant d'éviter le problème d'endotoxine souvent rencontré avec les bactéries. En outre, la levure parvient à réaliser des modifications post-traductionnelles qui sont souvent nécessaires à l'activité des glycosyltransférases.

La régénération de nucléotide-sucres est un exemple du recours croissant à la chimie enzymatique. L'inconvénient est qu'il est difficile de glycosyler de façon homogène un peptide nu. Le produit de réaction correspond toujours à un mélange hétérogène du produit glycosylé à divers degrés. Ceci n'est pas toujours gênant et il peut même être avantageux de disposer d'un mélange de glycoformes par exemple dans le cadre de l'élaboration d'un vaccin anti-cancéreux du moment que l'on a correctement caractérisé le mélange. Il reste toutefois l'option de pouvoir séparer les différents produits glycosylés par chromatographie. Si vraiment, on voulait s'affranchir de cette étape de purification, l'emploi de la synthèse chimio-enzymatique s'avère prometteuse pour la synthèse contrôlée de glycoconjugués.

IV.3. Synthèse chimio-enzymatique

Que ce soit pour la synthèse de nucléotides-sucres (naturels ou non) ou encore de glycoconjugués, combiner les avantages de la synthèse chimique avec ceux de la synthèse enzymatique reste la meilleure alternative.

Par exemple, dans le but de synthétiser des inhibiteurs de glycosyltransférases, l'équipe de Nishimura a eu recours à la synthèse chimio-enzymatique pour élaborer des

analogues fluorés d'UDP-GlcNAc (Feng *et al.*, 2004). La synthèse chimique permet d'accéder à des petites molécules non naturelles (ici des sucres-1-P modifiés) qui, utilisées comme substrats d'une pyrophosphorylase, conduisent rapidement et efficacement au nucléoside diphosphates. L'insertion d'une étape enzymatique dans la voie de synthèse limite la décomposition du diphosphate et conduit à des rendements plus élevés. En outre, la propriété de l'étape enzymatique permet de purifier aisément le nucléotide-sucres afin d'évaluer son pouvoir inhibiteur. La pyrophosphorylase est connue pour accepter des sucres non naturels dans son site actif (Ko *et al.*, 2005) et il va de soi que l'emploi de la synthèse enzymatique ne s'applique qu'à des molécules dont la structure est proche du substrat naturel ou encore à des enzymes de spécificité très large. Mais le panel d'enzymes disponibles est vaste et l'évolution des techniques permet aujourd'hui de réaliser des mutants d'enzymes dans le but d'élargir leur spécificité de substrat.

Un autre exemple des bénéfices de la synthèse chimio-enzymatique concerne la production de glycopeptides qui soient bien définis. Il faut alors utiliser la glycosylation chimique pour introduire les premières unités saccharidiques sur le peptide, ce qui permet de choisir les résidus qui vont être glycosylés. Ensuite, les chaînes peuvent être aisément allongées par l'action consécutive de diverses glycosyltransférases et permettre rapidement la construction d'une bibliothèque de produits synthétiques (Matsushita *et al.*, 2006).

Nous venons de voir dans ce chapitre les différentes méthodes couramment employées pour la synthèse de glycopeptides. Il s'avère que la synthèse chimique se trouve confrontée à de nombreuses difficultés lors de la formation du lien glycosidique et reste de manière générale limitée à de petites molécules. La synthèse enzymatique, au contraire, semble particulièrement bien adaptée à la production de glycomolécules comme en témoigne le nombre croissant de publications. La synthèse chimio-enzymatique combine les avantages des deux méthodes et l'emploi d'enzymes modifiées comme catalyseurs pour la synthèse de molécules actives est à l'heure actuelle en plein essor au niveau industriel comme dans la recherche académique.

DÉFINITION DES OBJECTIFS

DÉFINITION DES OBJECTIFS

Dans la partie introductive, nous avons démontré l'intérêt de disposer de quantités importantes de glycanes synthétiques (glycoconjugués ou polysaccharides) tant pour mener des études structurales et fonctionnelles sur les glycanes que pour un usage thérapeutique. La synthèse purement chimique de ces composés est coûteuse et peu rentable. La glycosylation enzymatique réalisée *in vitro* à partir d'enzymes recombinantes permet d'obtenir en peu d'étapes les produits dans la configuration souhaitée au carbone anomérique. Les facilités de purification et les rendements élevés de cette méthode en font un outil de choix pour la synthèse oligosaccharidique. Cependant, la plupart des enzymes impliquées dans la glycosylation utilisent des UDP-sucres comme source monosaccharidique et la difficulté d'obtenir de manière aisée et substantielle certains de ces nucléotides sucres est un frein à la production de glycoproduits. Notamment, l'UDP-GalNAc, précurseur dans de nombreuses étapes clé de la glycosylation, pose problème. Comme déjà évoqué précédemment, la synthèse de cette molécule requiert une stéréospécificité et une régiosélectivité qui handicapent la méthode de synthèse par voie chimique conduisant à des rendements faibles et des produits impurs.

La découverte de deux nouvelles enzymes permet d'envisager une nouvelle voie de synthèse enzymatique efficace de l'UDP-GalNAc (figure 25). Premièrement, la GalNAc Kinase GK2 permet la formation de GalNAc-1-P à partir de GalNAc (Pastuszak *et al.*, 1996a). L'UDP-HexNAc pyrophosphorylase AGX1 catalyse ensuite la phosphorylation du GalNAc-1-P à partir d'UTP (Szumilo *et al.*, 1996).

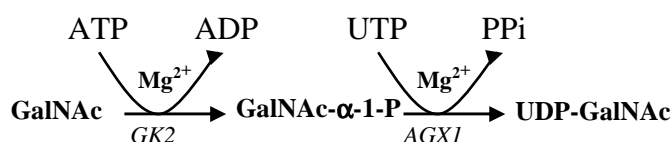


Figure 25. synthèse enzymatique de l'UDP-GalNAc

La purification et la caractérisation de la GalNAc kinase GK2 de rein de porc a permis d'identifier l'enzyme homologue chez l'homme (Pastuszak *et al.*, 1996b) et de comprendre que cette enzyme catalyse spécifiquement la phosphorylation du GalNAc. Les GK2 d'origine humaine ou bovine ont été étudiées soit après extraction de tissu, soit par expression de l'ADNc de la forme humaine dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Plus récemment, l'enzyme a été cristallisée ce qui permet une meilleure compréhension de la spécificité de substrat de cette enzyme (Thoden et Holden, 2005). La deuxième enzyme également découverte dans l'équipe d'Elbein est une UDP-HexNAc pyrophosphorylase qui catalyserait à la fois la formation d'UDP-GlcNAc et d'UDP-GalNAc à partir d'UTP et des osamines-1-P

DÉFINITION DES OBJECTIFS

appropriées (Szumilo *et al.*, 1996). Cependant l'étude d'une enzyme homologue d'abord trouvée chez l'homme (Diekman et Goldberg, 1994) puis clonée (Mio *et al.*, 1998) a permis de montrer que cette phosphorylase était en fait un dimère composé de deux protéines de séquences très voisines nommées AGX1 et AGX2 qui diffèrent seulement par l'insertion (pour AGX2) de 17 aminoacides dans la région C-terminale (Wang-Gillam *et al.*, 1998) : exprimées séparément dans les bactéries, les deux protéines AGX1 et AGX2 montrent une différence de spécificité qui est liée à l'insertion de la séquence peptidique. L'enzyme AGX1 s'est avérée spécifique de la formation de l'UDP-GalNAc alors qu'AGX2 forme principalement de l'UDP-GlcNAc. l'enzyme d'origine mammifère a été cristallisée (Wang-Gillam *et al.*, 1998, Peneff *et al.*, 2001).

Nous avons envisagé dans un premier temps de développer une production efficace de ces deux enzymes (GK2 et AGX1) de manière recombinante chez *E. coli* afin de disposer du nucléotide sucre UDP-GalNAc donneur de GalNAc pour de multiples GalNAc-transférases.

Un autre problème lié à l'utilisation des enzymes de Leloir pour la production *in vitro* de glycoconjugués concerne l'inhibition du transfert au fur et à mesure de la formation d'UDP dans le mélange réactionnel. Un volet de ma thèse a été consacré à la mise au point d'un bioréacteur dans lequel l'action combinée de cinq enzymes permet la glycosylation de divers substrats accepteurs (saccharidiques ou peptidiques) avec régénération de l'UDP-GalNAc (figure 26).

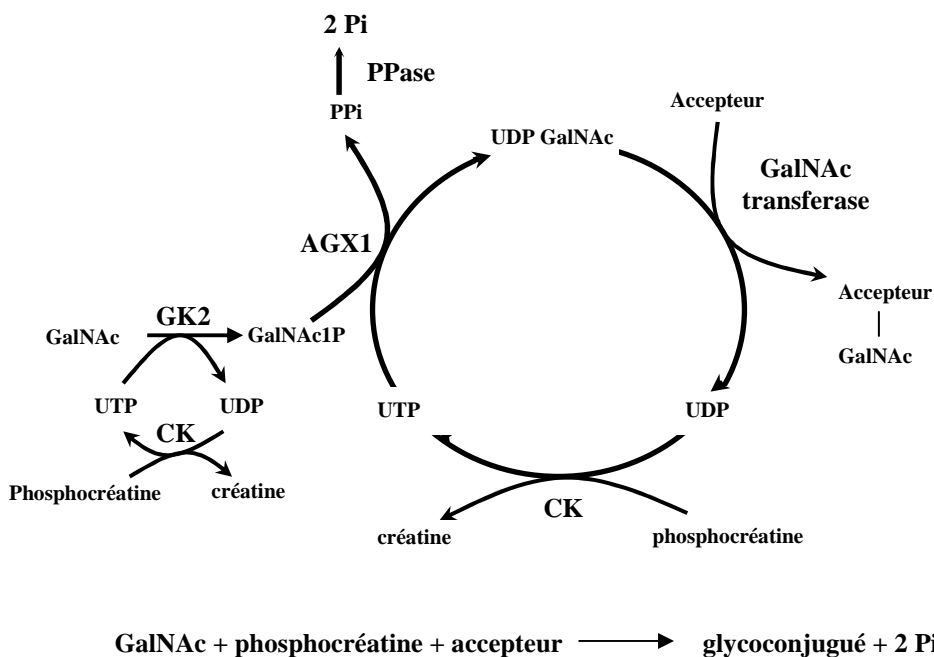


Figure 26. Bioréacteur pour la glycosylation de divers substrats accepteurs avec régénération de nucléotide-sucre UDP-GalNAc.

Les enzymes GK2 et AGX1 décrites précédemment catalysent la synthèse d'UDP-GalNAc à partir de GalNAc et d'UTP commercial. La pyrophosphatase inorganique PPA tire la réaction dans le sens de formation de l'UDP-GalNAc qui est immédiatement consommé et clivé par une GalNAc transférase responsable du transfert de GalNAc sur la molécule acceptrice. L'UDP libéré lors de la réaction est régénéré en UTP par une créatine kinase CK et n'est plus un frein à la glycosylation.

Puis nous avons voulu voir si ce bioréacteur permettait de glycosyler efficacement différents substrats d'intérêt thérapeutique comme par exemple des polymères de MUC1 ou encore la substance H. Le pouvoir immunogène des glycoconjugués synthétiques peut ensuite être évalué *in vivo* par une titration en anticorps spécifiques après plusieurs immunisations. Nous envisageons également d'utiliser ce bioréacteur afin d'évaluer *in vitro* la spécificité de glycosylation de trois ppGalNAc-Ts recombinantes (T1, T2 et T13) sur le peptide (MUC1)₂ et de dégager éventuellement des différences dans les positions glycosylées ou encore dans l'efficacité du transfert.

Nous avons vu dans la partie introductive que la réaction de glycosylation et en particulier le mécanisme de transfert du monosaccharide n'étaient pas toujours bien maîtrisés. Les sondes de glycoenzymes constituent des outils permettant une étude structurale et mécanistique des enzymes impliquées dans la biosynthèse oligosaccharidique. Dans le processus particulier de *O*-glycosylation, les ppGalNAc-Ts sont les premières enzymes à intervenir. Dans ce cas précis, l'élaboration de sondes repose sur la synthèse d'analogues de l'UDP-GalNAc. Bien que de nombreux chercheurs se soient adonnés à la synthèse de telles molécules, très peu d'entre elles ont été évaluées biologiquement le plus souvent faute de matériel. Dans une dernière partie de ma thèse, j'ai donc tenté d'utiliser les enzymes GK2 et AGX1 - normalement conçues pour la synthèse d'UDP-GalNAc pour synthétiser *in vitro* différents analogues de l'UDP-GalNAc, ceci afin d'étudier le transfert de GalNAc par la ppGalNAcT1. Les modifications de structure concernent le substituant porté par le carbone 2 du monosaccharide et sont schématisées par un groupement R dans la figure 27. Nous envisageons également de synthétiser les analogues désoxy UDP-GalNAc aux positions 3, 4 et 6 du motif GalNAc.

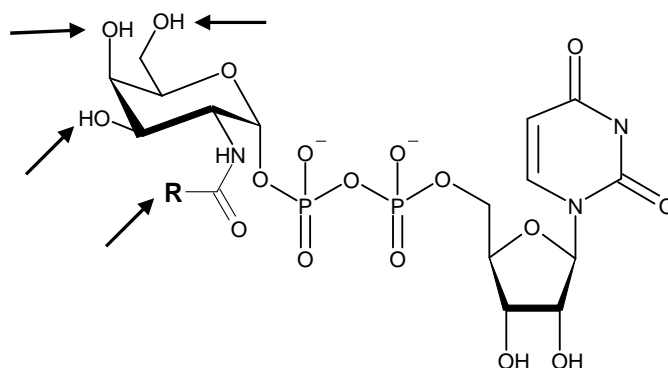


Figure 27. Modifications envisagées pour la synthèse d'analogues d'UDP-GalNAc. Le groupement *R* représente différentes chaînes aliphatiques ou non. Nous envisageons également la synthèse des analogues désoxy UDP-GalNAc aux positions 3, 4 et 6.

Ces sondes qu'elles soient transférées ou non permettront d'en apprendre davantage sur l'étape de transfert ainsi que sur la poche catalytique de l'enzyme. L'utilisation de la STD-NMR, une méthode à la pointe de la technologie, permet aujourd'hui de déterminer précisément les atomes du ligand qui sont en interaction directe avec l'enzyme. Nous tenterons d'évaluer par cette méthode les molécules que nous aurons synthétisées en espérant obtenir une réponse quant aux positions du substrat les plus impliquées. Les sondes qui sont transférées très lentement jouent le rôle d'inhibiteurs en occupant le site actif suffisamment longtemps pour ralentir le transfert du donneur naturel. Ces molécules non clivées sont des outils très utiles notamment pour la cristallisation des protéines puisqu'elles permettent d'obtenir l'enzyme dans sa conformation « active ». Ces inhibiteurs devraient en outre contribuer à déterminer le rôle des glycanes lors d'une étude *in vivo* des répercussions de l'inhibition.

MATÉRIEL & MÉTHODES

I. MATÉRIEL

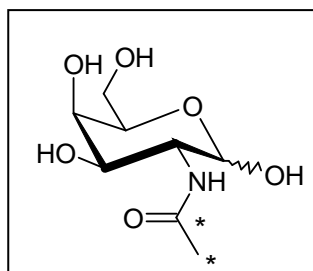
Les solvants utilisés en synthèse chimique et/ou en HPLC (MeOH, EtOH, ACN, DCM, Toluène, AcOEt) proviennent de chez Prolabo, Merck ou Sigma-Aldrich, les feuilles d'aluminium pour la CCM recouvertes de gel de silice 60 F₂₅₄ (épaisseur 0,2 mm) et la silice 40-70 µm (230-400 mesh) pour la purification par chromatographie flash ont été achetées chez Merck. Pour la synthèse enzymatique, les enzymes CK et PPA proviennent de chez Sigma, l'enzyme CIP, de chez New England Biolabs (NEB), et les protéases Arg-C et Asp-N, de chez Roche Applied Bioscience. Pour les enzymes non commerciales et petites protéines, les ADNc ont été achetés chez Open Biosystems, les amorces pour les PCR chez SIGMA-Genosys, le vecteur d'expression IMPACTTM-system chez NEB, les vecteurs pCR2.1 et pTrcHisB chez Invitrogen, les bactéries hôtes ER2566 et Rosetta chez NEB et Novagen respectivement, et le produit de lyse Y-PER plusTM chez Pierce. Pour les Western-blots, les anticorps anti-6His et les anticorps anti-anticorps de souris couplés à la phosphatase alcaline proviennent de chez Qiagen et Bio-Rad respectivement. Pour la purification des enzymes et produits, le gel de NI-NTA superflow est vendu par Qiagen, les résines échangeuses d'ions DOWEX et MR-3 par Sigma-Aldrich, la colonne Hi Trap Q XL ainsi que la résine de Sephadex G10 par Amersham Biosciences / GE et les colonnes Sep-Pak® C18 par Waters. Pour les Western-Blots, les membranes de nitrocellulose proviennent de chez Schleicher et Schuell BioScience et le réactif de révélation Western BlueTM de chez Promega. Le logiciel ImageQuant pour la quantification des bandes sur SDS-PAGE est issu de chez Molecular Dynamics. Les sources radioactives [³H] GalNAc et [³H] UDP-GalNAc sont fournies par American Radiolabelled Chemicals (ARC), le [³²P] ATP par Amersham et le [³H] UTP ainsi que le [¹⁴C] CH₃COONa par Perkin-Elmer. Pour les synthèses enzymatiques, la majorité des produits provient de chez Sigma, le trisaccharide H a été acheté chez Dextra Laboratories. Le papier pour la chromatographie provient de chez Whatman. Pour les calibrations en spectrométrie de masse, les calibrants Pepmix3 et Peptide Calibration Standard ont été achetés chez LaserBio Labs et Bruker Daltonics respectivement. Pour les essais d'immunisation, les souris consanguines C57Bl6 proviennent de la société IffaCredo, l'adjuvant Imject®Alum provient de chez Pierce, les plaques de microtitration ELISA de chez NUNC et les anticorps de chèvre anti Ig de souris couplés à la peroxydase de chez Bio-Rad.

II. SYNTHÈSE ET CARACTÉRISATION DES ANALOGUES DE GalNAc

Les protocoles de synthèse sont décrits pour chacun des analogues du GalNAc et la caractérisation chimique des produits par RMN et/ou Spectrométrie de Masse est également reportée. Les spectres de RMN pour le proton (RMN¹H) ont été enregistrés par Hervé Meudal (CBM, Orléans) sur un spectromètre Varian à 500 MHz ou à l'ICOA (Orléans) sur un spectromètre de la marque Bruker ADVANCE DPX à 250 MHz. Les spectres de RMN pour le carbone (RMN¹³C) ont été enregistrés à 32,89 MHz (ICOA). Les échantillons sont dissous dans D₂O ou CDCl₃ (environ 0,5 à 2 mg/600 µL) et les expériences sont effectuées à 25 °C. Les déplacements chimiques (δ) sont mesurés en ppm par rapport à la référence interne appropriée à chaque type de solvant et de noyau : pour le proton, D₂O (HOD, 4,79 ppm) et CDCl₃ (TMS, 0 ppm) et pour le carbone, D₂O (ACN additionnel, 119,68 ppm et 1,47 ppm) et CDCl₃ (raie centrale à 77,1 ppm). Les constantes de couplage (J) sont exprimées en Hz et la multiplicité des signaux est représentée par les lettres s (singulet), d (doublet), dd (doublet de doublet), t (triplet), q (quadruplet), m (multiplet) et peut être précédée de la lettre b (broad) quand le signal n'est pas suffisamment bien résolu.

Les composés ont été obtenus sous forme d'un mélange d'anomères en équilibre (donc non séparables). Quand la résolution des spectres le permettait, les différents signaux des protons ont été attribués en se référant par rapport aux données de la littérature obtenues pour des α -glycosides (Wieruszski *et al.*, 1990, Strecker *et al.*, 1992, Strecker *et al.*, 1995) ou des β -glycosides (Strecker *et al.*, 1994).

Les analyses par Spectrométrie de Masse ont été réalisées par Corinne Buré et Rémy Puppo (CBM, Orléans) par électrospray (ESI) sur un triple quadripôle (Quatro II, Waters) en mode positif ou négatif.

[¹⁴C] GalNAc

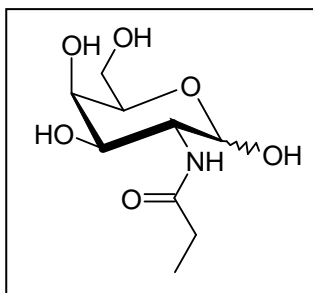
Masse molaire : 225,21

La source radioactive d'actétate de sodium (0,446 mg, 5,18 μ mol, 46 mCi/mmol) préalablement évaporée à sec est reprise avec 66 μ L d'une solution tamponnée d'HEPES pH 7,0 (100 mM) contenant de l'actétate de sodium froid (1,014 mg, 12,3 μ mol). Un mélange de chlorhydrate de galactosamine (5,8 mg, 26,9 μ mol) et d'EDC (4,1 mg, 21,4 μ mol) dans la solution tamponnée d'HEPES est ajouté et la solution est agitée la nuit à température ambiante. Une étape de chromatographie échangeuse d'anions (colonne MR-3, 2,5 mL) suivie d'une purification sur Sep-Pak (1 mL) permet de recueillir le [¹⁴C] GalNAc (7,2 μ mol, 40 %). L'expérience réalisée dans les mêmes conditions avec de l'actétate de sodium non radioactif permet de caractériser le produit par RMN.

RMN-¹H (500 MHz, D₂O), mélange d'anomères α et β (0,65 : 0,35) :

δ (anomère α) : 5,23 (d, $J_{1,2} = 4,0$, H1), 4,13 (dd, 1H, $J_{2,1} = 3,6$, $J_{2,3} = 11,2$, H2), 4,10 (bt, 1H, $J = 6,0$, H5), 4,00 (d, 1H, $J_{4,3} = 3,2$, H4), 3,90 (d, 1H, $J_{3,4} = 3,1$, H3), 3,82-3,65 (m, 2H, H6a et H6b), 2,05 (s, CH₃).

δ (anomère β) : 4,64 (d, $J_{1,2} = 8,0$, H1), 3,92 (dd, 1H, H4), 3,86 (dd, 1H, H2), 3,82-3,65 (m, 4H, H3, H5, H6a et H6b), 2,05 (s, CH₃).

N-propionylgalactosamine (1)

Masse molaire : 235,24

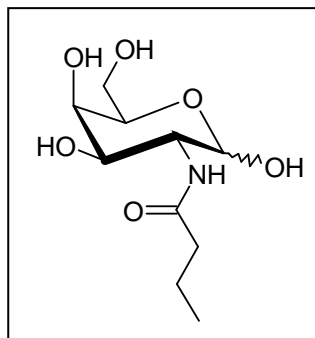
Un mélange de chlorhydrate de galactosamine (50 mg, 0,23 mmole) en solution aqueuse alcaline ($\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 0,2 M (2 mL)) et d'anhydride propionique (40 μL , 0,3 mmole) est agité 1h à température ambiante puis retraité avec de l'anhydride propionique (40 μL , 0,3 mmole) avant d'être agité 2h à température ambiante avec un pH maintenu entre 9,0 et 11,0 par addition répétée de solution alcaline (0,2 M $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$). Puis, le mélange est acidifié par addition de HCl 5N (0,5 mL), et après 1h d'agitation à température ambiante, est chargé sur une colonne échangeuse d'ions (MR-3, 50 mL), puis purifié sur Sep-Pak (1 mL) pour conduire au composé **1** (13,2 mg, 0,056 mmole, 24 %).

RMN-¹H (500 MHz, D₂O), mélange d'anomères α et β (0,63 :0,36):

δ (anomère α) : 5,23 (d, $J_{1,2} = 3,7$, H1), 4,14 (dd, 1H, $J_{2,1} = 3,6$, $J_{2,3} = 11,1$, H2), 4,11 (bt, 1H, $J = 6,1$, H5), 4,00 (d, 1H, $J_{4,3} = 2,9$, H4), 3,94-3,65 (m, 3H, H3, H6a et H6b), 2,32 (q, 2H, $J = 7,6$, **CH2**), 1,13 (t, $J = 7,6$, **CH3**).

δ (anomère β) : 4,66 (d, $J_{1,2} = 8,0$, H1), 3,94-3,65 (m, 6H, H2, H3, H4, H5, H6a et H6b), 2,31 (q, 2H, $J = 7,63$, **CH2**), 1,13 (t, $J = 7,64$, **CH3**).

SM (pos): (M + H)⁺, 236,1, (M + Na)⁺, 258,1.

N-butyrylgalactosamine (2)

Masse molaire : 249,27

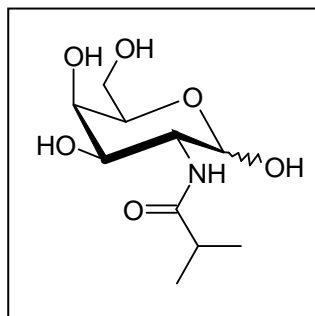
Une solution de 1,3-Dicyclohexylcarbodiimide (450 mg, 2,18 mmole) dans du DCM sec (1mL) est lentement ajoutée sous agitation à un mélange froid d'acide butyrique (200 μ L, 2,18 mmole) et de N-hydroxysuccinimide (251 mg, 2,18 mmole) dans du DCM sec (5 mL). Le mélange réactionnel est agité la nuit à TA et une analyse sur couche mince (9:1; DCM/MeOH) montre que la réaction est terminée. Après filtration, la solution est séchée sous vide. Le N-hydroxysuccinimidyl butyrate brut (400 mg) ainsi récupéré est engagé dans une deuxième étape sans purification. Le chlorhydrate de galactosamine (150 mg, 0,7 mmole) dans l'eau (1,5 mL) est activé par addition de NaHCO_3 (116 mg, 1,39 mmole) suivie de l'addition de la solution filtrée de NHS-butyrates (185 mg, 1 mmole) dans du THF (2 mL). Après agitation la nuit à TA, le mélange séché sous vide conduit à une huile jaune (500 mg). Une partie de cette huile brute (138 mg) purifiée sur Sep-Pak (6 mL) et sur colonne échangeuse d'ions (MR-3, 4 mL) permet de recueillir le mélange d'anomères de **2** sous forme d'une poudre blanche (11,8 mg, 0,047 mmole, 24 %), contenant 13% w/w de NHS résiduel.

RMN- ^1H (250 MHz, D_2O), mélange d'anomères α et β (0,6 : 0,4) :

δ (anomère α) : 5,25 (d, $J_{1,2} = 3,7$, H1), 4,15 (dd, 1H, $J_{2,1} = 3,7$, $J_{2,3} = 11,8$, H2), 4,12 (bt, 1H, $J = 6,1$, H5), 4,01 (d, 1H, $J_{4,3} = 2,7$, H4), 3,91 (d, 1H, $J_{3,4} = 2,9$, H3), 3,84-3,66 (m, 2H, H6a et H6b), 2,80 (s, 0,84H, NHS), 2,30 (t, $J = 7,22$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1,64 (m, 2H, $J = 7,2$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 0,93 (t, 3H, $J = 7,5$, CH_3).

δ (anomère β) : 4,66 (d, $J_{1,2} = 8,4$, H1), 3,94 (bd, 1H, H4), 3,87 (bs, 1H, H2), 3,84-3,66 (m, 4H, H3, H5, H6a et H6b), 2,80 (s, 0,56H, NHS), 2,29 (t, $J = 7,2$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1,64 (m, 2H, $J = 7,2$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 0,93 (t, 3H, $J = 7,52$, CH_3).

SM (neg): (M - H) $^-$, 247,5, (2M - H) $^-$, 497,06.

N-isobutyrylgalactosamine (3)

Masse molaire : 249,27

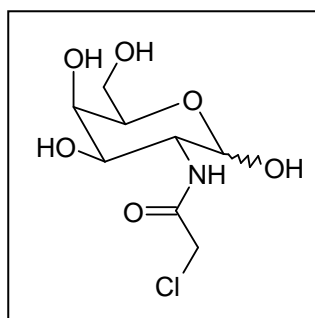
Un mélange de chlorhydrate de galactosamine (40 mg, 0,186 mmole) dans 1 mL d'une solution tamponnée avec de l'HEPES-NaOH pH 7,0, d'acide isobutyrique (22,4 μ L, 0,24 mmoles) et d'EDC (46,2 mg, 0,24 mmoles) est agité la nuit à TA. La solution passée sur colonne échangeuse d'ions (MR-3, 25 mL) et purifiée sur Sep Pak (1 mL) permet de recueillir le composé **3** (35,7 mg, 0,143 mmole, 77 %).

RMN-¹H (500 MHz, D₂O), mélange d'anomères α et β (0,44 : 0,56):

δ (anomère α) : 5,23 (d, $J_{1,2} = 3,7$, H1), 4,16-4,10 (m, 2H, H2 et H5), 4,01 (d, 1H, $J_{4,3} = 2,6$, H4), 3,93 (d, 1H, $J_{3,4} = 3,2$, H3), 3,81-3,69 (m, 2H, H6a et H6b), 2,61-2,55 (m, 1H, $J = 2,85$, CH), 1,1-1,15 (m, 6H, CH₂(CH₃)₂).

δ (anomère β) : 4,67 (d, $J_{1,2} = 8,4$, H1), 3,95 (bd, 1H, $J_{4,3} = 3,1$, H4), 3,90-3,85 (m, 1H, H2), 3,81-3,69 (m, 4H, H3, H5, H6a et H6b), 2,61-2,55 (m, 1H, $J = 2,85$, CH), 1,1-1,15 (m, 6H, CH₂(CH₃)₂).

SM (neg): (M - H)⁻, 247,5, (2M - H)⁻, 497,06.

2-chloroacétamido-2-désoxy-D-galactopyranose (4)

Masse molaire : 255,66

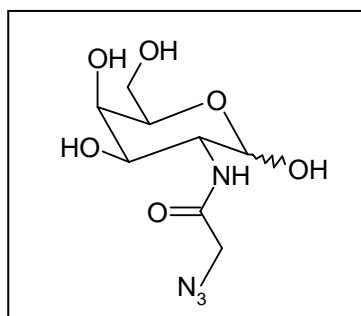
Le produit a été synthétisé selon la méthode décrite dans la littérature (Hang *et al.*, 2003). A partir d'un mélange de chlorhydrate de galactosamine (150 mg, 0,7 mmole) et d'anhydride chloroacétique (179 mg, 1 mmole), le composé **4** est récupéré sous forme de solide blanc après chromatographie sur gel de silice (éluant 8:2 DCM:MeOH) (150 mg, 0,587 mmole, 84 %).

RMN-¹H (250 MHz, D₂O), mélange d'anomères α et β (0,6 :0,4):

δ (anomère α) : 5,26 (d, $J_{1,2} = 3,7$, H1), 4, 20 (s, CH₂-Cl), 4,15-3,7 (m, 6H, H2, H3, H4, H5, H6a et H6b).

δ (anomère β) : 4,72 (d, $J_{1,2} = 8,4$, H1), 4,05 (s, CH₂-Cl), 4,15-3,7 (m, 6H, H2, H3, H4, H5, H6a et H6b).

SM (pos): (M + H₂O+H)⁺, 273,5, 275,5.

2-azidocétamido-2-désoxy-D-galactopyranose (5)

Masse molaire : 262,22

Le produit a été synthétisé selon la méthode décrite dans la littérature (Hang *et al.*, 2003). Un mélange du composé **4** (150 mg, 0,59 mmole), dissous dans du DMF anhydre (4 mL), et de NaN₃ (226 mg, 3,48 mmole) est agité la nuit à 50°C. Le mélange réactionnel est co-évaporé avec de l'acétone provoquant la précipitation de l'azide résiduel. Le produit **5** est isolé par filtration (137 mg, 0,52 mmole, 88 %).

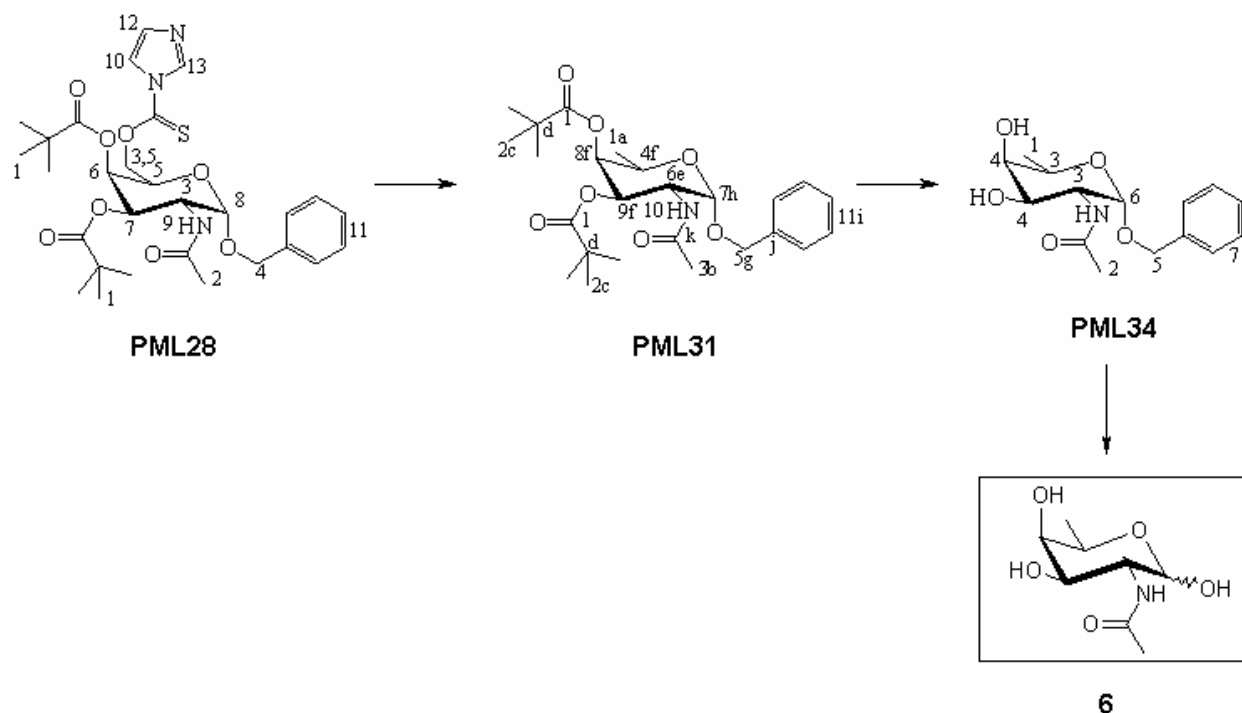
RMN-¹H (250 MHz, D₂O), mélange d'anomères α et β (0,7 :0,3):

δ (anomère α) : 5,27 (d, $J_{1,2} = 3,4$, H1), 4,21 (dd, 1H, $J_{2,1} = 3,6$, $J_{2,3} = 10,7$, H2), 4,10 (s, CH2), 4,15-3,5 (m, 5H, H3, H4, H5, H6a et H6b).

δ (anomère β) : 4,72 (d, $J_{1,2} = 8,4$, H1), 3,83 (s, CH2), 4,15-3,5 (m, 5H, H3, H4, H5, H6a et H6b).

SM (pos): (M + Na)⁺, 285,5.

6-désoxy-2-N-Acétylgalactosamine (6)



Masse molaire : 205,21

Le composé **PML34** a été synthétisé par Mathieu Laurent (ICOA, équipe d'Olivier Martin, Orléans). Le composé 2-Acétamido-2-désoxy-6-*O*-(imidazol-1-yl-thiocarbonyl)-3,4-di-*O*-pivaloyl- α -D-galactopyranoside de benzyle (1,14g) synthétisé selon la méthode décrite dans la littérature (Busca et Martin, 2004). (**PML28**) est dissous dans 60 mL de toluène et préalablement dégazée à l'Ar. L'AIBN (0,32 g, 1,9 mmole) et le TTMSS (0,6 mL, 1,9 mmole) sont ajoutés au mélange et le milieu réactionnel est chauffé à 90°C pendant 1h puis ramené à température ambiante pendant 30 min. Le solvant est évaporé sous pression réduite pour donner 1,73 g d'une huile jaune purifiée par chromatographie sur colonne de silice (gradient d'élution : éther de pétrole/AcOEt 3:1 à 1:1). Le produit d'intérêt, 2-Acétamido-2,6-didésoxy-3,4-di-*O*-pivaloyl- α -D-galactopyranoside de benzyle (**PML31**) est isolé sous la forme d'un solide blanc (0,49 g; 1,1 mmole; 58 % sur les 2 étapes).

RMN-¹H (250 MHz, CDCl₃) : δ : 7,40-7,30 (m, 5H, H11), 5,57 (d, 1H, $J = 10,1$, H10), 5,24 (dd, 1H, $J = 3,1$; $10,7$, H9), 5,22 (s, 1H, H8), 4,93 (d, 1H, $J=3,7$, H7), 4,72 et 4,51 (2d AB, 2H, $J = 11,9$, H5), 4,64 (dt, 1H, $J = 3,5$; $10,2$, H6), 4,12 (m, 1H, H4), 1,87 (s, 3H, H3), 1,30 et 1,12 (2s, 18H, H2), 1,11 (d, 3H, H1).

RMN-¹³C (62,9 MHz, CDCl₃) : δ 16,4 (CH₃; C-a); 23,6 (CH₃; C-b); 27,4 et 27,7 (CH₃; C-c); 39,2 et 39,6 (C-d); 48,1 (CH; C-e); 66,0; 69,3 et 70,5 (3CH; C-f); 70,4 (CH₂; C-g); 97,9 (CH; C-h); 126,3; 128,4 et 129,0 (CH; C-i); 137,5 (C-j); 170,0 (C-k); 178,4 et 178,8 (C-l).

Une solution de **PML31** (0,14 g, 0,3 mmole) est ajoutée à une solution de sodium (0,04 g, 1,7 mmole) dans 10 mL de MeOH. Le mélange est maintenu agité pendant 18 h. Après avoir ajouté 2 mL d'eau, la solution est concentrée et le résidu est extrait au MeOH pour donner une huile jaune correspondant au produit 2-Acétamido-2,6-didésoxy- α -D-xylo-hexopyranoside de benzyle (**PML34**) (79 mg, 0,267 mmole, 89 %).

RMN-¹H (250 MHz, D₂O) : δ : 7,42 (m, 5H, H7), 4,95 (d, 1H, $J = 2,5$, H6), 4,80 et 4,52 (2d, 2H, $J = 11,9$, H5), 4,10-3,90 (m, 2H, H4), 3,80-3,50 (m, 2H, H3), 1,90 (s, 3H, H2), 1,20 (d, 3H, $J = 6,6$, H1).

Le produit **PML34** a été débenzylé par Sophie Front-Deschamps (ICOA, équipe d'Olivier Martin, Orléans). 27 mg du produit (0,091 mmole) sont dissous dans un mélange Isopropanol/DCM (6:2 v:v). Après addition de 1 mL d'acide acétique, le milieu réactionnel est dégazé sous vide puis mis sous pression atmosphérique d'hydrogène. Le mélange est agité 72 h à température ambiante avant d'être filtré sur membrane Millipore (Nylaflo 25 μ m), concentré puis coévaporé 2 fois avec du toluène et séché sous vide. Le résidu est repurifié dans le pentane et récupéré sous forme d'un précipité avant d'être purifié par chromatographie sur colonne de silice (gradient d'éluion : DCM/Acétone 3:1 à 0:1) pour donner le produit **6** (18,6 mg, 0,091 mmole, 100 %).

RMN-¹H (250 MHz, CD₃OD), mélange d'anomères α et β (0,58 : 0,41):

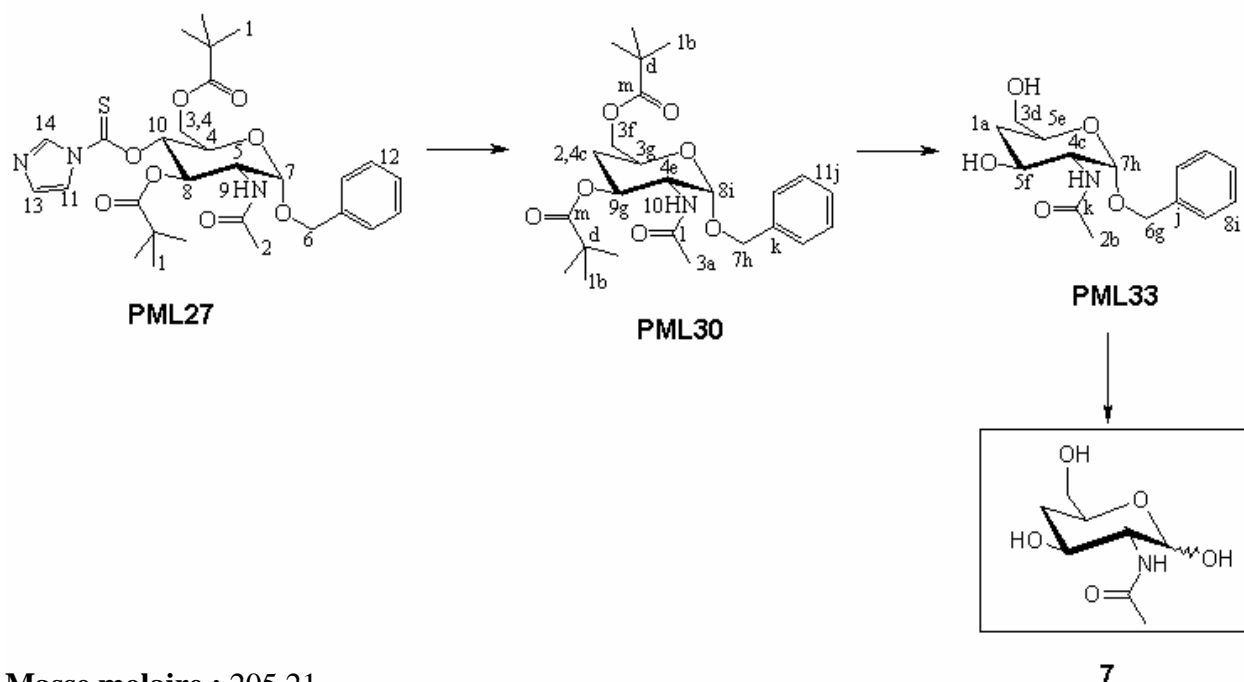
δ (anomère α) : 5,06 (d, $J_{1,2} = 2,2$, H1), 4,20-3,20 (m, 6H, H2, H3, H4, H5, H6a et H6b), 1,99 (s, 3H, NH-CO-CH₃), 1,40-1,10 (m, 3H, CH-CH₃).

δ (anomère β) : 4,51 (d, $J_{1,2} = 7,8$, H1), 4,20-3,20 (m, 6H, H2, H3, H4, H5, H6a et H6b), 1,99 (s, 3H, NH-CO-CH₃), 1,40-1,10 (m, 3H, CH-CH₃).

SM (pos): (M + H)⁺, 206,02.

Rendement global de synthèse pour 6 : 51 %

4-désoxy-2-N-Acétalgalactosamine (7)



Masse molaire : 205,21

Le composé PML33 a été synthétisé par Mathieu Laurent (ICOA, équipe d'Olivier Martin, Orléans). Le composé de départ 2-Acétamido-2-désoxy-4-*O*-(imidazol-1-yl-thiocarbonyl)-3,6-di-*O*-pivaloyl- α -D-galactopyranoside de benzyle (**PML27**) (1,32 g, 1,9 mmole) synthétisé par M. Laurent selon la méthode décrite dans la littérature (Busca et Martin, 2004) et dissous dans 40 mL de toluène est préalablement dégazé à l'Ar. L'AIBN (0,32 g, 1,9 mmole) et le TTMSS (0,6 mL, 1,9 mmole) sont ajoutés au mélange et le milieu réactionnel est chauffé à 90°C pendant 1h puis ramené à température ambiante pendant 30 min. Le solvant est évaporé sous pression réduite pour donner 1,74 g d'une huile jaune séparée par chromatographie sur colonne de silice (éluant : éther de pétrole/AcOEt 3:1 vers 1:1). Le produit d'intérêt, 2-Acétamido-2,4-didésoxy-3,6-di-*O*-pivaloyl- α -D-xylo-hexopyranoside de benzyle (**PML30**) est isolé sous la forme d'une huile transparente (0,55 g, 1,2 mmole, 61 % sur les 2 étapes).

RMN-¹H (CDCl₃, 250 MHz) : δ : 7,20-7,40 (m, 5H, H11), 5,66 (d, 1H, $J = 9,7$, H10), 5,17 (dt, 1H, $J = 5,0$; 10,9, H9), 4,93 (d, 1H, $J = 3,5$, H8), 4,73 et 4,46 (2d AB, 2H, $J = 11,9$, H7), 4,24 (dt, 1H, $J = 3,5$; 10,3, H6), 4,11 (m, 3H, H5), 2,01 (dd, 1H, $J = 3,1$; 11,6, H4), 1,89 (s, 3H, H3), 1,65 (d, 1H, $J = 11,6$, H2), 1,23 et 1,15 (2s, 18H, H1).

RMN-¹³C (CDCl₃; 62,9 MHz) : δ 23,2 (CH₃; C-a); 26,9 et 27,2 (CH₃; C-b); 32,8 (CH₂; C-c); 38,7 et 38,8 (C-d); 52,1 (CH; C-e); 65,7 (CH₂; C-f); 66,2 et 68,1 (2CH; C-g); 69,3 (CH₂; C-h); 97,3 (CH; C-i); 128,0; 128,1 et 128,6 (CH; C-j); 136,9 (C-k); 169,7 (C-l); 178,2 et 178,7 (C-m).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Le produit **PML30** (0,25 g, 0,54 mmole) est ajouté à une solution de sodium (0,04 g, 1,7 mmole) dans du MeOH (15 mL). Le mélange est maintenu agité pendant 18 h. Après avoir ajouté 2 mL d'eau, la solution est concentrée et le résidu est extrait au MeOH pour donner une huile jaune du produit 2-Acétamido-2,4-didésoxy- α -D-xylo-hexopyranoside de benzyle (**PML33**) (140 mg, 0,47 mmol, 88 %).

RMN-¹H (D₂O, 250 MHz) : δ : 7,41 (m, 5H, H8), 4,94 (d, 1H, $J = 3,5$, H7), 4,80 et 4,50 (2d, 2H, $J = 11,9$, H6), 3,95 (m, 1H, H5), 3,69 (dd, 1H, $J = 3,8$; 10,7, H4), 3,56 (m, 1H, H3), 2,01 (dd, 1H, $J = 4,7$; 12,6, H1'), 1,93 (s, 3H, H2), 1,42 (q, 1H, $J = 11,6$, H1).

RMN-¹³C (D₂O; 62,5 MHz) : δ 23,2 (CH₃; C-a); 36,7 (CH₂; C-b); 56,8 (CH; C-c); 65,0 (CH₂; C-d); 66,4 (CH; C-e); 70,6 (CH; C-f); 70,8 (CH₂; C-g); 97,8 (CH; C-h); 129,6; 129,9 et 130,0 (CH; C-i); 138,4 (C-j); 175,0 (C-k).

Le produit **PML33** a été débenzylé par Sophie Front-Deschamps (ICOA, équipe d'Olivier Martin, Orléans). 27 mg (0,091 mmole) du produit sont dissous dans un mélange Isopropanol/DCM (6 : 2 v :v). Après addition de 1 mL d'acide acétique, le milieu réactionnel est dégazé sous vide puis mis sous pression atmosphérique d'hydrogène. Le mélange est agité 72 h à température ambiante avant d'être filtré sur membrane Millipore, concentré puis coévaporé 2 fois avec du toluène et séché sous vide. Le résidu est repurifié dans le pentane et récupéré sous forme d'un précipité avant d'être purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : DCM/Acétone 1/1 puis 1/2 puis 0/1) pour donner le produit **7** (19 mg, 0,092 mmole, 100 %).

RMN-¹H (250 MHz, CD₃OD), mélange d'anomères α et β (0,47 :0,53):

δ (anomère α) : 5,10 (bs, H1), 4,10-3,40 (m, 6H, H2, H3, H4, H5, H6a et H6b), 1,95 (s, 3H, NH-CO-CH₃), 1,45-1,10 (m, 2H, H4a et H4b).

δ (anomère β) : 4,45 (d, $J_{1,2} = 6,7$, H1), 4,10-3,40 (m, 6H, H2, H3, H4, H5, H6a et H6b), 1,95 (s, 3H, NH-CO-CH₃), 1,45-1,10 (m, 2H, H4a et H4b).

SM (pos): (M + Na)⁺, 228,5.

Rendement global de synthèse pour 7 : 53 %

III. PRODUCTION DES ENZYMES ET PEPTIDES

III.1. Clonage et expression des enzymes

Milieux

Milieu SOB : 20 g de peptone, 5 g de d'extrait de levure, 0,5 g de NaCl et 0,186 g de KCl pour 1L. Juste avant utilisation, le milieu est supplémenté avec du MgCl₂ (10 mM). Milieu LB : 10 g de peptone, 5 g de d'extrait de levure et 10 g de NaCl. Tous les milieux sont ajustés à pH 7,0 avant d'être autoclavés et avant utilisation, de l'ampiciline 100 µM est ajoutée.

Lyses

Lyse douce : les cellules récoltées sont resuspendues dans de l'Y-PER plusTM (200 µL pour 100 mg de cellules) et 1 mM de PMSF, puis agitées doucement à température ambiante pendant 30 min. Le surnageant de lyse est séparé du lysat par centrifugation à 5 000 x g pendant 10 min. Lyse forte : les cellules récoltées sont resuspendues dans du Tris HCl (116 mM, pH 6,8), SDS (2 %), glycérol (10 %) et contenant du bleu de bromophénol (Laemmli, 1970) avec du DTT (0,1 M), puis bouillies à 100°C pendant 5 min.

GK2 et AGX1.

Pour cloner les inserts en phase avec une séquence codant pour six His dans un vecteur d'expression procaryote, les séquences codantes pour AGX1 et GK2 ont été amplifiées par PCR. Une seule PCR est réalisée pour AGX1 alors que deux PCR avec deux couples d'amorces différents ont été effectuées avec GK2, permettant d'obtenir deux constructions pour la protéine recombinante. Dans tous les cas, les fragments d'ADN ont été amplifiés, munis de deux nouvelles extrémités BamHI. La PCR pour AGX1 et la première PCR pour GK2 (cas 1) ont conservé un codon stop (TGA) en 3' ce qui a conduit à une forme "courte" des protéines alors que la seconde PCR pour GK2 (cas 2) a supprimé ce codon stop générant une forme "longue" de la protéine. Les mélanges PCR (volume total, 15,1 µL) contenaient 100 ng d'ADN, les amorces (20µM), les dNTP (0,13 mM), du MgCl₂ (1,5 mM) et de la Taq polymérase (0,5 U) le tout dans le tampon recommandé pour l'enzyme. Après chauffage à 95°C pendant 1 min, 30 cycles (60°C pendant 30 s, 72°C pendant 1 min, 95°C pendant 30 s) ont été programmés, suivis de 10 min à 72°C. Une ligation des morceaux d'ADN amplifiés par PCR avec le vecteur pCR2.1 a permis ensuite d'obtenir ces morceaux en plus grande quantité. Le vecteur pCR2.1 ne possédant pas de sites BamHI, une digestion avec cette

enzyme a permis de récupérer les fragments d'intérêt qui ont ensuite été insérés par ligation dans le vecteur d'expression pTrcHisB inductible à l'IPTG.

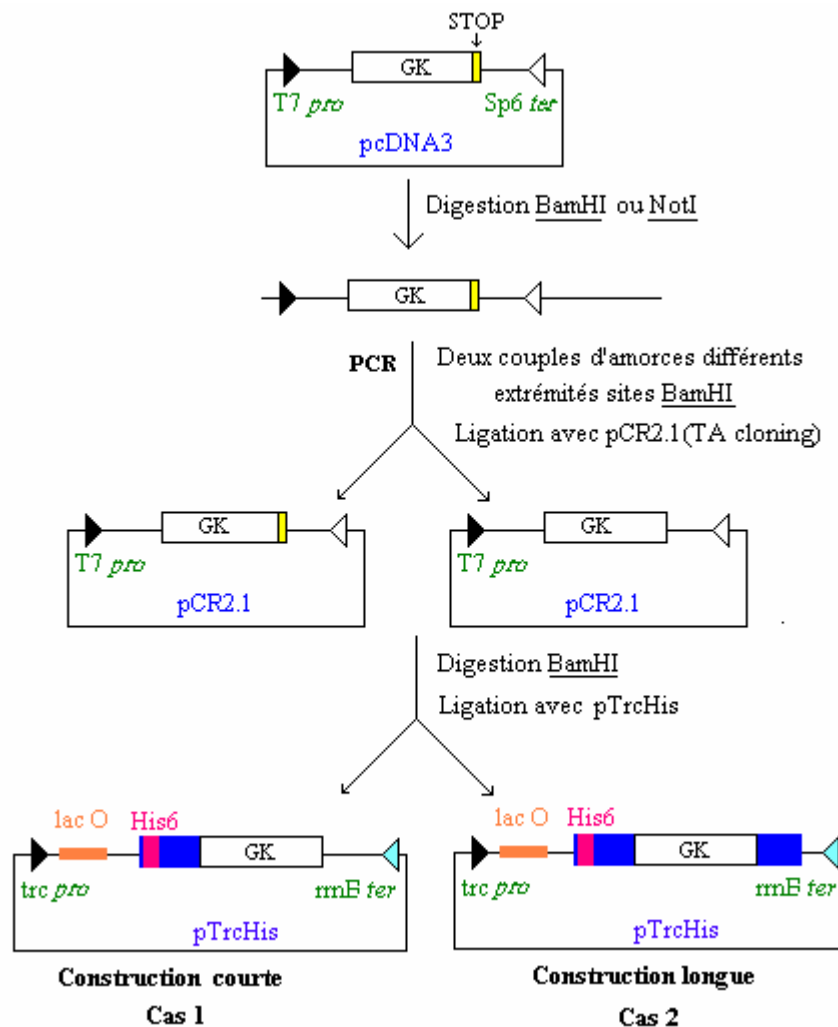


Figure 28. Stratégie utilisée pour obtenir les constructions pour GK2.

Des bactéries *E.Coli* DH5 α ont ensuite été transformées par les plasmides modifiés pour le clonage et des digestions par ECORI pour la forme "courte" de GK2, par BglIII pour la forme "longue" de GK2 et par XhoI pour AGX1 ont confirmé l'orientation de l'insert dans les clones sélectionnés. Ensuite, les plasmides sélectionnés ont été introduits dans des *E.Coli* Rosetta et ER2566 pour l'expression des protéines d'intérêt sous pression de sélection à l'ampicilline (100 μ g/mL). Pour le plan d'expérience réalisé avec GK2, le clone d' *E.Coli* ER2566 sélectionné pour la forme "longue" a été cultivé pour chaque essai dans un volume total de 10 mL dans un tube Falcon de 50 mL stérile. Les différentes cultures ont été incubées à 15°C ou 37°C et l'expression a été induite avec 0,5 ou 1 mM IPTG. Une fois la DO finale souhaitée atteinte, une biomasse équivalente pour chaque expérience a été prélevée. Après centrifugation, les culots ont été lysés avec une quantité appropriée d'YPER-S et agités sur une roue pendant 20 minutes. Après centrifugation (5 000 x g pendant 10 min), les lysats protéiques ont été récupérés pour préparer les échantillons de SDS-PAGE.

Forme courte GK2 : 54 kDa

Amorce sens : CGGGATCCAATGGCTACAGAGAGCCCTGCTAC

Amorce antisens : GCGGATCCTTCAGGCCTCAAGCAAACCAAAGC

Séquence :

MGGSHHHHHHGMASMTGGQMGRDLYDDDDKDPMATESPATRRVQVAEHPRLKEMFNKFGSI
PKFYVRAPGRVNIIGEHIDYCGYSVLPMAVEQDVLIAVEPVKTYALQLANTNPLYPDFSTSA
NNIQIDKT
KPLWHNYFLCGLKGIQEHFGLSNLTGMNCLVDGNIPPSSGLSSSSALVCCAGLVTLTVLGRNLSKVELA
EICAKSERYIGTEGGMDQISFLAEEGTAKLIEFSPLRATDVKLPSGAVFVIANSCEMKAATSHFNIR
VMECRLAAKLLAKYKSLQWQDKVLRLEEVQAKLGLSLEEMLLVTEALHPEPYNPEEICRCLGISLEELR
TQILSPNTQDVLIFKLYQRAKHVYSEAAARVLQFKKICEEAPENMVQLLGELMNQSHMSCRDMYECSCP
ELDQLVDICRKFQAQGSRLTGAGWGGCTVSMVPADKLPFLANVHKAYYQRSDGSLAPEKQSLFATKP
GGGALVLEA

Forme longue GK2 : 57 kDa

Amorce sens : GGATCCAATGGCTACAGAGAGCCCTG

Amorce antisens: GGATCCGGCCTCAAGCAAAC

Séquence :

MGGSHHHHHHGMASMTGGQMGRDLYDDDDKDPMATESPATRRVQVAEHPRLKEMFNKFGSI
PKFYVRAPGRVNIIGEHIDYCGYSVLPMAVEQDVLIAVEPVKTYALQLANTNPLYPDFSTSA
NNIQIDKT
KPLWHNYFLCGLKGIQEHFGLSNLTGMNCLVDGNIPPSSGLSSSSALVCCAGLVTLTVLGRNLSKVELA
EICAKSERYIGTEGGMDQISFLAEEGTAKLIEFSPLRATDVKLPSGAVFVIANSCEMKAATSHFNIR
VMECRLAAKLLAKYKSLQWQDKVLRLEEVQAKLGLSLEEMLLVTEALHPEPYNPEEICRCLGISLEELR
TQILSPNTQDVLIFKLYQRAKHVYSEAAARVLQFKKICEEAPENMVQLLGELMNQSHMSCRDMYECSCP
ELDQLVDICRKFQAQGSRLTGAGWGGCTVSMVPADKLPFLANVHKAYYQRSDGSLAPEKQSLFATKP
GGGALVLEAGPSSRSAAGTIWFEAWLFWRMRENFPDTD

AGX : 64 kDa

Amorce sens : CGGGATCCAATGAACATTAATGACCTCAAACCTCCG

Amorce antisens: GCGGATCCTTCAAATACCATTTTTTACCAGCTCATG

Séquence :

MGGSHHHHHHGMASMTGGQMGRDLYDDDDKDPMNINDLKLTLKAGQEHLRFWNELEEAQQVE
LYAELQAMNFEELNFFFQKAIEGFNQSSHQKNVDARMEPVPREVLGSATRDQDQLQAWESEGLFQISQ
NKVAVLLLAGGQGTRLGVA YPKGMYDVGLPSRKTFLQIQAERILKLQQA EKY YGNKCIIPWYIMTSG
RTMESTKEFFTKHKYFGLKKNVIFVQQGMLPAMSFQDKIILEEKNKVS MAPDGNGLYRALAAQNIV
EDMEQRGIWSIHVYCVDNILVKVADPRFIGFCIQKGADCGAKVVEKTNPTEPVGVVCRVDGVYQVVEY
SEISLATAQKRSSDGRLLFNAGNIANHFFTVPFLRDVVNVYEPQLQHHVAQKKIPYVDTQGGQLIKPDKP
NGIKMEKFVDFIQFAKKFVYEVLEDEFSPKLNADSQNGKDNPTTARHALMSLHHCWVLNAGGHFI
DENSRLPAIPRQATNGKSETITADVNHNLKDANDVPIQCEISPLISYAGEGLESYVADKEFHAPLIIDEN
GVHELKNGI

Calcul des contrastes pour le plan d'expérience

On teste différents paramètres : la température (A), la DO atteinte à l'induction (B), la DO atteinte à l'arrêt de la culture (C), le milieu de culture (D) et la concentration en IPTG (E). Le calcul des contrastes s'effectue en colonnes : pour chaque paramètre, on additionne les valeurs d'intensités obtenues pour les différents essais en prenant soin d'avoir préalablement multiplié ces valeurs d'intensité par un signe – (quand dans l'essai, le paramètre prend son niveau inférieur) ou par un signe + (quand dans l'essai, le paramètre prend son niveau supérieur). La valeur calculée est ensuite divisée par le nombre d'essais (ici 8).

Exemple pour le contraste du paramètre A dans le premier plan d'expérience (plan initial) :

$$L_A = (-7,34+4,89-10,54+8,23-11,77+23,75-16,39+17,09)/8 = 0,99$$

Exemple d'analyse d'un plan d'expérience avec le plan initial :

$$L_A = A + CE \approx 0 \text{ d'où } A = 0 \text{ et } CE = 0$$

$$L_B = B + DE \approx 0 \text{ d'où } B = 0 \text{ et } DE = 0$$

$$L_C = C + AE = 4,75$$

$$L_D = D + BE \approx 0 \text{ d'où } D = 0 \text{ et } BE = 0$$

$$L_E = E + AC + BD = 2,17$$

ppGalNAc-Ts et GTA.

Les glycosyltransférases ppGalNAc-T1 bovine, et ppGalNAc-T2, ppGalNAc-T13, et GTA humaines ont été produites et purifiées par Véronique Piller sous forme soluble dans la levure *P. pastoris*. Les séquences codant pour les protéines correspondant aux aminoacides 54 à 559 pour la ppGalNAc-T1 (Duclos *et al.*, 2004), 51 à 571 pour la ppGalNAc-T2, 52 à 556 pour la ppGalNAc-T13 et 40 à 353 pour la GTA ont été insérées en 3' de la séquence du signal α -facteur du vecteur d'expression pPICZ α A modifié pour introduire une séquence 6His en N-ter et un tag FLAG en C-ter.

III.2. Synthèse des peptides

Les peptides (STP)₅AG, MUC1 (PPAHGVTSAPDTRPAPGSTA), (MUC1)₂ et PADRE chimique (aKXVAAWTKaA, X étant la cyclohexylalanine) ont été synthétisés dans le laboratoire d' Agnès Delmas par Philippe Marceau, Agnès Delmas et Isidore Decostaire, respectivement (CBM, Orléans). La production du (MUC1)₈ recombinant et de ses dérivés ainsi que leur purification ont été réalisées par Nicole Bureau avec un kit IMPACT™-system (Intein-Mediated Purification with an Affinity Chitin binding Tag, Chong *et al.*, 1997).

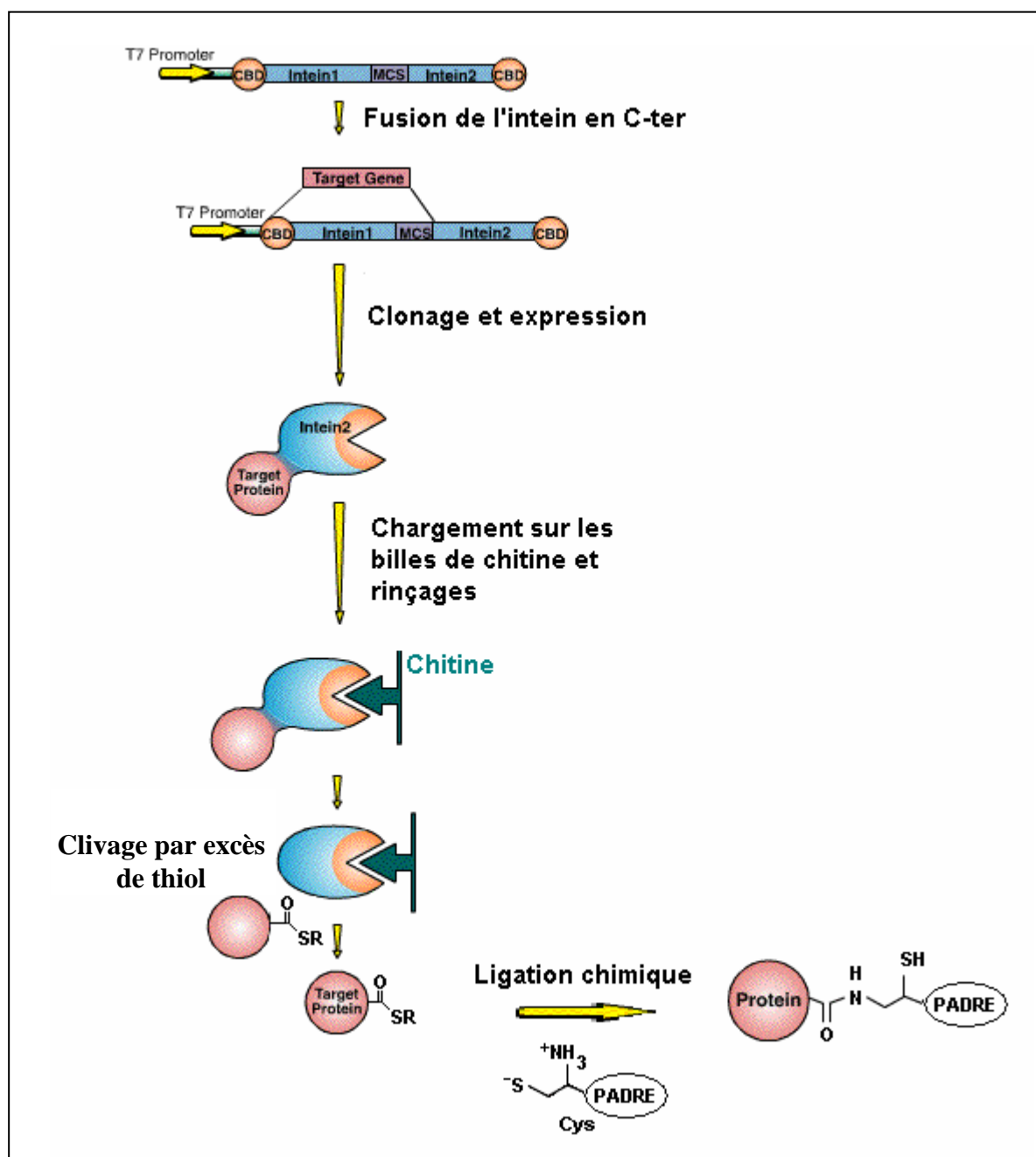


Figure 29. Méthode de l'« expressed protein ligation ».

Dans ce système (Figure 29), le gène synthétique codant pour la protéine (MUC1)₈ ou (MUC1)₈ PADRE biologique (Mélanie Duneau et Friedrich Piller, non publié) est cloné dans le vecteur pTwin1 en 5' de la séquence codant pour l'intéine MxeGyrA. Pour l'expression de la protéine de fusion, les bactéries ER2566 sont transformées avec ce vecteur. Après lyse à l'Y-Per, la protéine de fusion est purifiée par affinité sur Ni-NTA grâce à l'étiquette 6His présente sur la protéine. La présence d'un domaine de fixation de la chitine, permet une seconde purification par chromatographie d'affinité. La protéine de fusion est immobilisée sur chitine et les peptides (MUC1)₈ ou (MUC1)₈ PADRE biologique sont libérés par clivage induit par un excès de thiol (incubation 16h à 4°C). La pureté des protéines ainsi obtenues (>95%) est estimée par SDS-PAGE.

Pour la synthèse du (MUC1)₈ PADRE chimique, le peptide (MUC1)₈ obtenu après coupure au MESNA est mis en présence de l'épitope PADRE obtenu par synthèse chimique (dans le laboratoire d'A. Delmas) et possédant une Cys en N-ter. Le groupement thiol du résidu Cys effectue une première attaque nucléophile sur le carbonyle du groupement thioester. La conformation qui en résulte favorise un réarrangement spontané dans lequel le groupement NH₂ attaque le groupement carbonyle et libère le thiol formant ainsi une liaison peptidique (figure 30).

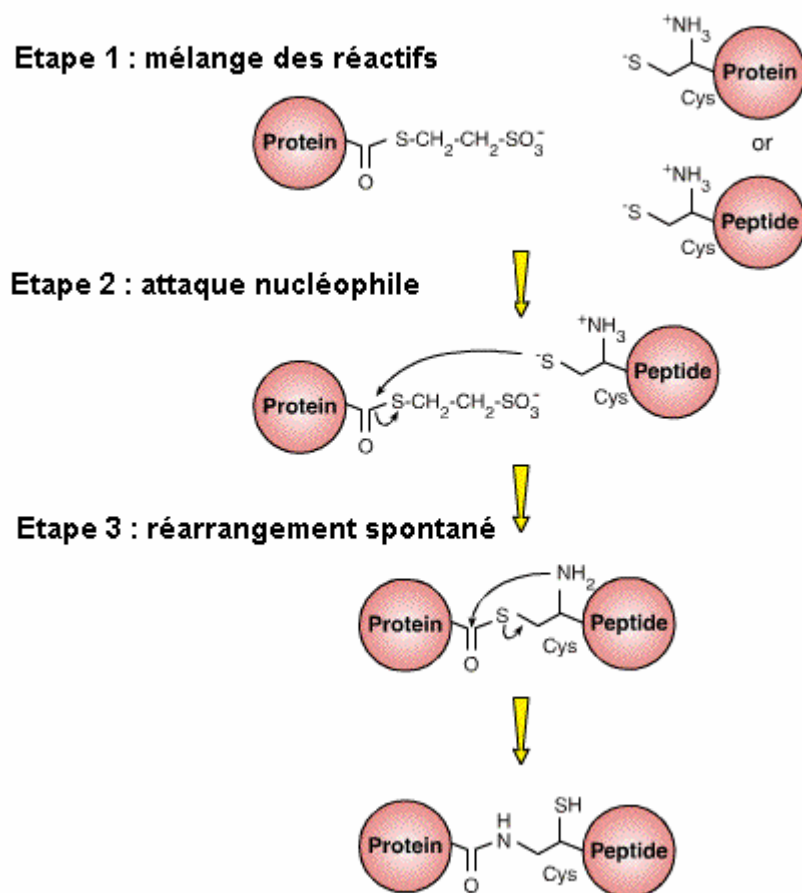


Figure 30. Mécanisme de ligation entre le peptide (MUC1)₈ et le PADRE chimique

(MUC1)8 : 16500 Da

MHHHHH⁸AS(APDTRPAPGSTAPPAHGVTS)8MRM

(MUC1)8 intéine : 44582 Da

MHHHHH⁸AS(APDTRPAPGSTAPPAHGVTS)⁸MRMCITGDALVALPEGESVRIADIVPGARPNSDNAIDL
KVLDRHGPNVLADRLFHSGEHPVYTVRTVEGLRVTGTANHPLLCLVDVAGVPTLLWKLIDEIKPGDYA
VIQRSAFSVDCAFGARGKPEFAPTTYTVGVPLVRFLEAHRDPDAQAIADELTDGRFYAKVASVTD
AGVQPVYSLRVDTADHAFITNGFVSHATGLTGLNSGLTTNPGVSAWQVNTAYTAGQLVTYNGKTYKC
LQPHTSLAGWEPSNVPALWQLQ

(MUC1)8 PADRE biologique : 18261 kDa

MHHHHH⁸AS(APDTRPAPGSTAPPAHGVTS)⁸AKFVAAWTKAAKETS⁸MRM

(MUC1)8 PADRE chimique : 17887 Da

MHHHHH⁸AS(APDTRPAPGSTAPPAHGVTS)⁸MRCaKXVAAWTKaA

IV. SYNTHÈSE ENZYMATIQUE DES DÉRIVÉS SACCHARIDIQUES

IV.1. Synthèse enzymatique des sucres-1-P et des UDP-sucres

Pour les sucres-1-P, les mélanges réactionnels contenaient de l'ATP (3 mM), du MgCl₂ (5 mM), de la SAB (0,1%), l'enzyme GK2 (28 µg/mL) et les différents analogues de GalNAc (3 mM) dans une solution de Tris HCl (75 mM, pH 8,8). Les mélanges ont été incubés la nuit à 37°C et les produits ont été purifiés par chromatographie échangeuse d'anions (DOWEX Cl) puis dessalés par gel filtration (G10). Pour les UDP-sucres, les mélanges réactionnels contenaient de l'UTP (4 mM), de l'ATP (4 mM), du MgCl₂ (5 mM), de la SAB (0,1%) et les différents analogues de GalNAc (3 mM) dans une solution de Tris HCl (75 mM, pH 8,8). La réaction enzymatique est initiée par l'addition de l'enzyme AGX1 (9,4 µg/mL), de la PPA (4U/mL), et de l'enzyme GK2 (28 µg/mL). Les mélanges ont été incubés la nuit à 37°C. Une purification par FPLC (échange d'anions) suivie d'une étape de chromatographie liquide sur C18 (HPLC) et d'un dessalage sur G10 permettent de recueillir les UDP-sucres sous forme de sels de triéthylammonium. Le 3d-UDP-GalNAc a été synthétisé par voie chimique par Patricia Busca (ICOA, équipe d'Olivier Martin, Orléans) selon la méthode décrite dans la littérature (Busca et Martin, 2004). Pour plus de clarté, les dérivés saccharidiques ont été numérotés (tableau V). Les masses molaires exactes de ces composés sont également reportées.

Nature du substituant du galactose	Sucres-1-P	UDP-sucres
<i>2-désoxy-2-Acétamido</i>	GalNAc -1-P (301)	UDP-GalNAc
<i>2-désoxy-2-Propionamido</i>	9 (315)	16 (621)
<i>2-désoxy-2-Butyramido</i>	10 (329)	17 (635)
<i>2-désoxy-2-Isobutyramido</i>	11 (329)	18 (635)
<i>2-désoxy-2-Chloroacétamido</i>	12 (335)	19 (641)
<i>2-désoxy-2-Azidoacétamido</i>	13 (342)	20 (648)
<i>C6-désoxy-2-désoxy-2-Acétamido</i>	14 (285)	21 (591)
<i>C4-désoxy-2-désoxy-2-Acétamido</i>	15 (285)	22 (591)
<i>C3-désoxy-2-désoxy-2-Acétamido</i>	-	23 (591)

Tableau V. Numérotation des différents dérivés saccharidiques (sucres-1-P et UDP-sucres) dont il est question dans le travail de thèse et masses nominales associées.

GalNHCOCH₂Cl-1-P (12).

RMN¹H (500 MHz, D₂O) δ : 5,45 (dd, 1H, $J_{H1,P} = 7,0$; $J_{1,2} = 3,2$; H1), 4,25 (bd ; 1H ; $J_{2,3} = 10,8$, H2), 4,20 (s, 2H, CH₂), 4,17 (ddd, 1H, $J_{5,6a} = 6,3$; H5), 4,04 (d, 1H ; H4), 4,00 (dd, 1H, $J_{3,2} = 10,7$; $J_{3,4} = 3,1$; H3), 3,78 (dd, 1H, $J_{6a,6b} = 11,4$; H6a), 3,75 (dd, 1H, $J_{6b,6a} = 11,5$; H6b).

SM (pos): (M - H)⁻, 334,03 et 336,11; (2M - H)⁻, 669, 15 et 671, 04

GalNAz-1-P (13).

RMN¹H (500 MHz, D₂O) δ : 5,46 (dd, 1H, $J_{H1,P} = 7,7$; $J_{1,2} = 3,5$; H1), 4,27 (ddd ; 1H ; $J_{2,3} = 11,2$; $J_{2,P} = 2,6$, H2), 4,17 (ddd, 1H, $J_{5,6a} = 6,0$, H5), 4,09 (d, 2H, $J = 8,6$, CH₂), 4,04 (d, 1H, $J_{4,3} = 2,7$; H4), 3,99 (dd, 1H, $J_{3,2} = 10,9$; $J_{3,4} = 2,9$; H3), 3,78 (dd, 1H, $J_{6a,6b} = 11,2$; $J_{6a,5} = 7,3$, H6a), 3,75 (dd, 1H, $J_{6b,6a} = 11,8$; $J_{6b,5} = 5,1$, H6b).

IV.2. Synthèse enzymatique des glycopeptides

Les glycopeptides ont été synthétisés en incubant pendant 16h à 37°C un mélange réactionnel (50 μ L) contenant du GalNAc (3,9 mM), de l'UTP (0,2 mM), de la phosphocréatine (20 mM), du MnCl₂ (5 mM), du glycérol (5%, vol/vol), de la SAB (0,1g /100 mL), les différentes enzymes, 20 ng d'AGX1 (0,6 mU), PPA, (100 ng, 100 mU), ppGalNAc-T1 (254 ng, 0,8 mU), CK, (530 ng, 150 mU) et GK2 (700 ng, 1,26 mU) ainsi que les différents peptides accepteurs (STP)₅ (0,4 mM), MUC1 (0,53 mM), (MUC1)₂ (0,26 mM), (MUC1)₈ (0,4 mg/mL), (MUC1)₈ PADRE biologique (1 mg/mL), (MUC1)₈ PADRE chimique (1 mg/mL) dans de l'imidazole pH 7,0 (75 mM). Les glycosylations à plus grosse échelle ont été réalisées en incubant des volumes réactionnels plus importants (1 à 2 mL) en respectant les proportions de substrats et enzymes. La synthèse du tétrasaccharide A du groupe sanguin a été réalisée à 37°C avec un mélange réactionnel (50 μ L) contenant du GalNAc (3,9 mM), de l'UTP (0,2 mM), de la phosphocréatine (20 mM), du MnCl₂ (5 mM), du glycérol (5%, vol/vol), de la SAB (0,1g /100 mL), les différentes enzymes, 20 ng d'AGX1 (0,6 mU), PPA, (100 ng, 100 mU), GTA (1,2 μ L, 0,63 mU), CK, (530 ng, 150 mU) et GK2 (700 ng, 1,26 mU) ainsi que le trisaccharide H (Fuc α (1-2)Gal β (1-4)GlcNAc, 1,2 mM) dans de l'imidazole pH 7,0 (75 mM). La purification des glycopeptides porteurs d'une étiquette 6His ((MUC1)₈ et ses dérivés) a été réalisée par chromatographie d'affinité sur Ni-NTA.

V. PURIFICATION DES ENZYMES ET PRODUITS

V.1. Chromatographie d'affinité sur Ni-NTA

Les peptides et protéines qui ont été produits dans les bactéries ou les levures sont tous munis d'une étiquette 6His en N-ter qui rend possible leur purification par chromatographie d'affinité sur résine Ni-NTA. Le surnageant de lyse douce est dilué par deux et ajusté avec du NaCl (300 mM), du tampon phosphate pH 8.0 (50 mM), de l'imidazole (10 mM) (= tampon de chargement) auquel est ajouté dans le cas du (MUC1)₈ PADRE chimique, du DTT (0,5 mM). L'incubation sur le gel de Ni-NTA en présence d'imidazole permet de réduire la fixation non spécifique. Le gel est préalablement rincé avec le tampon de chargement puis incubé en «batch» avec le lysat pendant deux heures à 4 °C sous une agitation douce. Le gel est ensuite rincé avec le tampon de chargement. Puis les enzymes ou peptides d'intérêt fixés au gel sont élués avec une solution d'imidazole 250 mM ajustée à pH 7 en présence de glycérol 30% dans le cas des enzymes GK2, AGX1 et du peptide (MUC1)₈ PADRE chimique. Du PMSF (1 mM) et du DTT (0,5 mM) sont ajoutés à chaque fraction éluee pour les enzymes GK2 et AGX1. Les protéines sont ensuite analysées par SDS-PAGE et les fractions d'intérêt sont réunies. L'enzyme AGX1 est stockée à -20°C à raison de 0,78 mg/mL en présence de DTT (0,5 mM), de PMSF (1 mM), d'EDTA (1 mM), d'azide (0,05 %) et de glycérol (30 %) dans du tampon Tris HCl pH 7,5 (20 mM). L'enzyme GK2 est d'abord dialysée contre 1L de tampon phosphate pH 8,0 (50 mM) avant conservation à -20 °C (0,35 mg/mL) en présence de MgCl₂ (1 mM) et de glycérol (30 %). Les glycosyltransférases sont soit lyophilisées et stockées à -20 °C, soit conservées à 4°C en présence d'imidazole pH 7,0 (200 mM), DTT (1 mM), et de PMSF (1 mM) à raison de 2 à 10 mg de protéine par mL.

V.2. Chromatographie échangeuse d'ions

Résine DOWEX Type I (1 x 8, forme Cl⁻)

La purification des sucres-1-P est réalisée sur colonne échangeuse d'anions DOWEX. Les produits porteurs de charges négatives sont retenus sur la colonne et élués progressivement avec un gradient en bicarbonate d'ammonium. La détection du sucre-1-P est effectuée par radioactivité ou par révélation d'un spot sur couche mince avec une solution d'acide sulfurique (5% dans l'EtOH).

Résine DOWEX Marathon MR-3 (formes H⁺ et OH⁻)

La purification de plusieurs analogues de GalNAc a été effectuée sur colonne échangeuse d'ions mixtes MR-3 DOWEX. Les mélanges sont chargés sur la colonne et les produits

d'intérêt de charge neutre sont immédiatement élués avec de l'eau alors que les impuretés résiduelles chargées comme le chlorhydrate de galactosamine et les sels restent fixés au support. La détection des analogues saccharidiques est effectuée par révélation d'un spot sur couche mince avec une solution d'acide sulfurique (5% dans l'EtOH).

FPLC

Les purifications FPLC des nucléotides-sucres ont été effectuées sur un appareil Äkta (Pharmacia / Amersham Biotechniques / GE) avec détection UV à 254 nm et une colonne échangeuse d'anions HiTrap Q XL (5 mL). Les réactions (synthèse des UDP-sucres) sont stoppées puis diluées 7 fois avec une solution eau/MeOH 50 :50. Les phases A et B contiennent respectivement de l'eau et une solution de bicarbonate d'ammonium (1 M). Le chargement du mélange est réalisé en présence de 5 % B à 3mL/min. Gradient : de 5% B à 25 % B sur 400 mL. Les fractions collectées sont réunies et concentrées avant d'être purifiées par HPLC.

V.3. Chromatographie liquide sur C18

Sep-Pak.

Pour une purification rapide sur support C18, les composés sont chargés sur colonne Sep-Pak. Les produits polaires comme les saccharides sont élués avec une solution aqueuse de bicarbonate d'ammonium (25 mM) alors que les composés moins polaires comme les peptides et glycopeptides sont élués après rinçage à l'eau avec un mélange ACN/eau 50 :50.

HPLC.

Pour les nucléotides-sucres, les fractions collectées en sortie de FPLC ont été purifiées par HPLC en phase inverse sur une colonne C18 (nucléosil, 300 Å, 5 µm, 250 x 10,5 mm) avec une pompe Merck-Hitachi L7100, un détecteur à barrette de diode Merck-Hitachi L-7455 et une interface Merck-Hitachi D-7000. Les solvants A et B contiennent respectivement de l'eau avec 20 mM d'ATEA et une solution ACN/eau (10 :90 v/v) avec 20 mM d'ATEA. Gradient à 3 mL/min : isocratique 0 % B pendant 15 min puis de 0 % B à 20 % B pendant 25 min. La purification a été suivie sur une gamme de longueurs d'ondes (214-350 nm), la détection des produits d'intérêt étant réalisée à 262 nm.

V.4. Gel filtration

Il s'agit d'une chromatographie d'exclusion ou encore d'un tamisage moléculaire. Cette technique permet la séparation des molécules en fonction de leur taille et de leur forme. Par cette étape, les produits sucres-1-P et UDP-sucres sont dessalés. On utilise pour cela des

résines de gel poreux, ici Sephadex G10 (25 mL, volume de séparation entre 0 et environ 700 Da). Les échantillons (200 µL) sont injectés dans la colonne sous un faible débit d'eau (15 mL/h). Les grosses molécules comme les UDP-sucres (590 à 648 Da) sont exclues et sont donc éluées les premières, au niveau du volume mort. Les petites et moyennes molécules (triéthylacétate d'ammonium) sont éluées plus tardivement, car leur inclusion dans les mailles du gel freine leur migration.

VI. CARACTÉRISATION DES PEPTIDES ET PRODUITS

VI.1. Chromatographie sur papier

Pour le suivi de la glycosylation enzymatique des peptides *in vitro*, les sources radioactives [³H] UTP ou [³H] GalNAc ont été utilisées. A la fin de l'incubation, la répartition en espèces radioactives (donc porteuses d'un groupement [³H] uridique dans le cas de l'emploi de [³H] UTP ou porteuse d'un [³H] GalNAc dans l'autre cas) dans le mélange réactionnel est analysée par chromatographie sur papier. La cuve est saturée en solvant et pour chacun des échantillons à analyser, la totalité du mélange réactionnel (contenant 10.000 cpm) est déposée sous forme de «spot» sur du papier Whatman (3 MM). Les composés migrent dans une solution EtOH/acétate d'ammonium 1M 70 :30 v:v pendant 20h avec comme témoin de migration le bleu de toluidine. Pour chaque produit, la bande de papier correspondant à la migration est découpée en morceaux identiques qui sont comptés pour leur teneur en radioactivité. Pour le cycle enzymatique, l'échantillon avait été incubé 15h à 37°C dans les conditions standard de glycosylation.

VI.2. Spectrométrie de masse et RMN

Toutes les analyses de spectrométrie de masse ont été réalisées par le service de spectrométrie de masse du CBM. Les petites molécules (< 800 Da) comme les UDP-sucres, ou les dérivés saccharidiques (sucre modifiés et sucres-1-P) ont été analysées par ESI en mode négatif. Les échantillons (4 µL) qui contiennent les espèces ionisées en solution dans un mélange ACN/eau 50:50 avec 0,1 % de TEA sont injectés dans le tube capillaire sous un faible débit (20 µL/min). Sous l'application d'un fort champ électrique (ddp = -2.6 kV) et d'un flux d'azote chaud coaxial au capillaire, il se forme un "électrospray" dont les espèces chargées pourront être séparées en fonction de leur rapport masse/charge (m/z) lors de leur passage

dans l'analyseur de masse quadripolaire. La masse indiquée est dans ce cas la masse monoisotopique de l'ion étudié.

Pour les molécules de plus grande taille (polypeptides et glycopeptides), les analyses ont été réalisées par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation / Time Of Flight) en mode linéaire positif ou mode réflectron positif sur un Autoflex (Bruker Daltonics) équipé d'un laser N₂ émettant à 337 nm. Cette méthode (Karas et Hillenkamp, 1988) consiste à analyser les molécules en présence d'un excès de matrice. Ici 0,5 µL d'échantillon sont dilués dans 4,5 µL d'une solution saturée d'acide α-cyano-4-hydroxycinnamique dans un mélange de solvants contenant 2:1 H₂O : ACN et 0,1% de TFA. Un aliquot de 0,5 µL de la solution résultante est déposé sur la cible MALDI (cible en or prétraitée selon la méthode en couche ultra-mince décrite dans la littérature (Cadène et Chait, 2000)). Un co-cristal de matrice et d'analyte opaque blanc commence à se former au niveau du dépôt en quelques secondes. Dès que ce dépôt devient homogène, l'excès de liquide est éliminé par aspiration sous vide. La plaque échantillon est transférée à l'intérieur du spectromètre de masse dans la zone où la source est maintenue sous vide ($\sim 3 \cdot 10^{-7}$ mbar). La matrice absorbe à la longueur d'onde utilisée pour l'irradiation laser, ce qui a pour effet d'énergiser et de sublimer la matrice, créant un milieu à haute énergie/température qui favorise la désorption et l'ionisation de l'analyte. Les molécules de matrice ionisées en phase gazeuse transfèrent un ou plusieurs protons aux molécules de l'échantillon. Après un délai de quelques centaines de nanosecondes, les ions sont accélérés en direction d'un tube de vol et du détecteur, eux aussi maintenus sous vide. Le rapport m/z des ions est fonction du temps de vol qui est facilement mesuré par chronométrage de l'arrivée des ions au détecteur. Le détecteur est de type hybride : une plaque à micro-canaux sensible aux particules (ici les ions moléculaires) émet des électrons, qui sont amplifiés par un scintillateur émetteur de photons couplé à un photomultiplicateur de type channeltron. Dans le cas des petits peptides ((MUC1) et (STP)₅AG), la masse indiquée correspond à la masse monoisotopique. Pour les autres peptides de masse plus élevée, la masse indiquée est la masse moyenne. Dans un souci de précision, les masses moyennes indiquées pour (MUC1)₈ et ses dérivés ont été recalculées à partir des ions multi-chargés.

VII. TESTS ET ANALYSES BIOCHIMIQUES

VII.1. SDS-PAGE et Western-Blot

L'analyse des protéines se fait par SDS-PAGE (Laemmli, 1970) avec un gel séparatif à 8, 9 ou 12% d'acrylamide, selon la taille de la protéine à analyser, après réduction en DTT 100 mM pendant 5 min dans l'eau bouillante. Une fois la migration terminée, les protéines sont soit colorées au bleu de Coomassie, soit transférées sur membrane de nitrocellulose avant l'immunodétection. Après le transfert, la membrane est préalablement rincée 2 x 6 min avec du TBS puis saturée en SAB 3 % (w/v) pendant 1h à TA. Tous les rinçages ont une durée de 6 min et sont effectués à TA. Après deux rinçages en Tween 20 (0,05 %), Triton X 100 (0,2 %) dans du TBS, puis deux rinçages en TBS, la membrane est incubée pendant 1h à TA avec une solution d'anticorps Anti-6His (1/1000), en présence de BSA (3%) dans du TBS. Après deux rinçages en Tween 20 (0,05 %), Triton X 100 (0,2%) dans du TBS, suivi d'un rinçage en TBS, la membrane est incubée pendant 45 min à TA avec une solution d'anticorps de chèvre anti-anticorps de souris et couplé à la phosphatase alcaline (1/) en présence de Tween 20 (0,05 %) dans du TBS. Après deux rinçages en Tween 20 (0,05 %), Triton X 100 (0,2 %) dans du TBS et un rinçage en TBS, la révélation est effectuée avec un substrat commercial de la phosphatase alcaline, le Western BlueTM.

VII.2. Dosages enzymatiques et détermination des paramètres cinétiques

Pour toutes les enzymes, une unité est définie comme une μ mole de produit transférée par minute. Le dosage enzymatique utilise des substrats radioactifs comme le [³H] GalNAc pour GK2, le [³H] UTP pour AGX1 ou encore le [³H] UDP-GalNAc pour les différentes GalNAc transférases. Le dosage repose sur la mesure de la radioactivité incorporée ou transférée lors de la réaction enzymatique. La réaction est incubée 20 min à 37°C au pH approprié et en présence des substrats et cofacteurs nécessaires au transfert. Chaque test est effectué en triple exemplaire.

Détermination des constantes cinétiques

Les constantes catalytiques K_m et V_{max} des enzymes GK2 et AGX1 pour les différents substrats saccharidiques sont déterminées en variant la concentration de ces substrats. Pour l'enzyme GK2, les mélanges réactionnels contenant du [³²P] ATP (3 mM, 500-1000 cpm/nmole), du MgCl₂ (5 mM), de la SAB (0,1%), l'enzyme GK2 (100-200 ng, 0,18-0,36 mU selon le saccharide) et les différents analogues de GalNAc (0-30 mM) dans une solution de

Tris HCl (75 mM, pH 8,8) sont incubés pendant 20 minutes à 37°C. La réaction est stoppée par addition d'eau et le mélange est chargé sur une colonne DOWEX. Le sucre-1-P formé retenu sur la colonne est radiomarqué et les fractions de ce produit éluées avec du bicarbonate d'ammonium (100 mM) permettent d'évaluer sa quantité. Pour l'enzyme AGX1, les mélanges réactionnels contenant du [³H] UTP (4 mM, 400-1000 cpm/nmole), du MgCl₂ (5 mM), de la SAB (0,1%), l'enzyme AGX1 (31 ng, 0,9 mU) et les différents sucres-1-P (0-10 mM) dans une solution de Tris HCl (75 mM, pH 8,8) sont incubés pendant 20 minutes à 37°C. Après dénaturation de l'enzyme AGX1 par chauffage à 80°C pendant 6 minutes, l'enzyme CIP (0,8 U) est ajoutée au mélange qui est incubé pendant 2h30 à 37°C. La déphosphorylation est stoppée par l'ajout de 725 µL d'une solution de MeOH:eau 50:50 et le mélange est déposé sur une colonne échangeuse d'anions DOWEX. L'UDP-sucres est la seule espèce marquée résistante à la CIP et donc retenue sur la colonne et une élution rapide avec du bicarbonate d'ammonium 1M permet d'évaluer la quantité de produit formé par comptage radioactif. Dans les deux cas, les expériences sont réalisées en triplicate et l'utilisation de la représentation de Lineweaver Burk permet de calculer les paramètres cinétiques.

Evaluation des analogues de l'UDP-GalNAc comme substrats de la ppGalNAc-T1

Les mélanges réactionnels (25 µL) contenant le peptide accepteur (STP)₅AG (0,4 mM), de la SAB (0,1g/100 mL), du MnCl₂ (15 mM), la ppGalNAc-T1 (25,4 ng, 0,08 mU), la CIP (2,5 U) et les différents analogues d'UDP-GalNAc (**16, 19, 20, 22 et 23**) (1 mM) dans une solution tamponnée de MES pH 6,5 sont incubés 16 h à 37°C. La réaction est stoppée par l'addition de 250 µL d'une solution eau/MeOH 50 :50 puis l'échantillon est analysé par spectrométrie de masse.

VII.3. Essais d'immunisation et titration en anticorps

Ces expériences ont été réalisées par Nicole Bureau.

Essai de fixation sur l'alum

Les deux composés (MUC1)₈ et (MUC1)₈ glycosylé repris dans le PBS sont mis en présence d'alum (4 % dans une solution aqueuse d'hydroxyde de magnésium à 40 mg/mL) à raison de 25 µL pour 6 µg de produit et laissés en contact avec l'adjuvant 30 min à température ambiante avec agitation régulière. Après centrifugation, les surnageants sont récupérés et analysés par SDS-PAGE afin d'évaluer la quantité de produit fixée.

Immunsation des souris

Chacun des immunogènes a été dialysé contre 1L de PBS la nuit à 4°C. Les souris utilisées pour l'immunisation sont toutes de sexe féminin et âgées de 2 à 3 mois au moment des

immunisations. Pour chaque souris et pour chaque immunisation, 25 µg de produit ont été dissous dans 200 µL de PBS puis mélangés à 100 µL d'alum. La totalité de la solution (soit approximativement 0,8 ppm du poids de la souris en produit immunogène) a été injectée en sous-cutané à chaque souris préalablement anesthésiée. L'opération a été répétée à 3 semaines d'intervalle. Une quinzaine de jours après les immunisations, le sang a été prélevé dans le sinus rétro-orbital de chaque souris puis laissé coagulé avant d'être centrifugé. Les sérums ont été congelés à -20°C en attente des analyses ELISA.

Tests ELISA

Le (MUC1)₈ ou le (MUC1)₈ glycosylé (50 ng par puits) en solution dans le tampon carbonate/bicarbonate 200 mM pH 9,6 (50 µl) ont été incubés dans les puits des plaques de microtitration pendant la nuit à température ambiante. Les plaques ont ensuite été rincées trois fois avec du PBS. Les sites non recouverts ont été saturés en ajoutant la gélatine 1% dans le PBS (150 µl par puits). Les plaques ont été mises à incuber 30 min à 37°C puis rincées trois fois avec du PBS contenant 0,25 % de Tween 20. Les solutions de sérum diluées dans le PBS (50 µl) ont été déposées dans trois puits chacune. Les plaques recouvertes d'un film plastique ont été mises à incuber 1h à 37°C ou à température ambiante selon l'analyse avant d'être rincées trois fois avec du PBS contenant 0,25 % de Tween 20. La solution d'anticorps de chèvre anti-IgG ou anti-IgM de souris couplés à la peroxydase (1/3000 dans du PBS contenant 0,1% de BSA ; 50 µl par puits) a alors été incubée 1h à 37°C. Après trois rinçages de cet anticorps secondaire avec du PBS contenant 0,25 % de Tween et deux rinçages avec du PBS, le substrat de l'enzyme peroxydase, l'ABTS (0,2 mg/ml, tampon acétate de sodium/acide acétique (100 mM) pH 5, 100 µl par puits), a été ajouté. Après 20 min à température ambiante, la réaction a été bloquée avec l'acide oxalique à 0,2 % dans l'eau (50 µl par puits). La lecture de l'absorbance à 405 nm permet d'évaluer le taux d'immunoglobulines retenues sur le MUC et de tracer les courbes de titration.

VII.4. Expériences de STD-NMR

Cette technique permet d'étudier les interactions protéines-ligands en solution (Meyer et Peters, 2003). Pour cela, les signaux de résonance de la protéine sont sélectivement saturés par application d'un champ de radio fréquence sur un type de proton (méthyles ou aromatiques) de la macromolécule qui n'existe pas dans le ligand. Par diffusion de spin, l'effet de saturation est rapidement propagé à l'ensemble de la protéine puis transféré aux atomes du ligand en interaction avec la protéine. L'efficacité du transfert dépend de la distance entre les atomes d'hydrogène du ligand fixé et la protéine. Le ligand fixé à la protéine s'échangeant avec le ligand libre dans la solution, l'effet de saturation est observé sur le ligand libre. Dans les conditions de saturation, les protons les plus proches de la surface protéique voient l'intensité de leurs signaux diminuer. La soustraction du spectre obtenu dans les conditions de saturation au spectre obtenu sans saturation aboutit au spectre de différence STD (figure 17). Ce spectre STD fait apparaître uniquement les signaux correspondant aux protons du ligand en interaction avec la protéine.

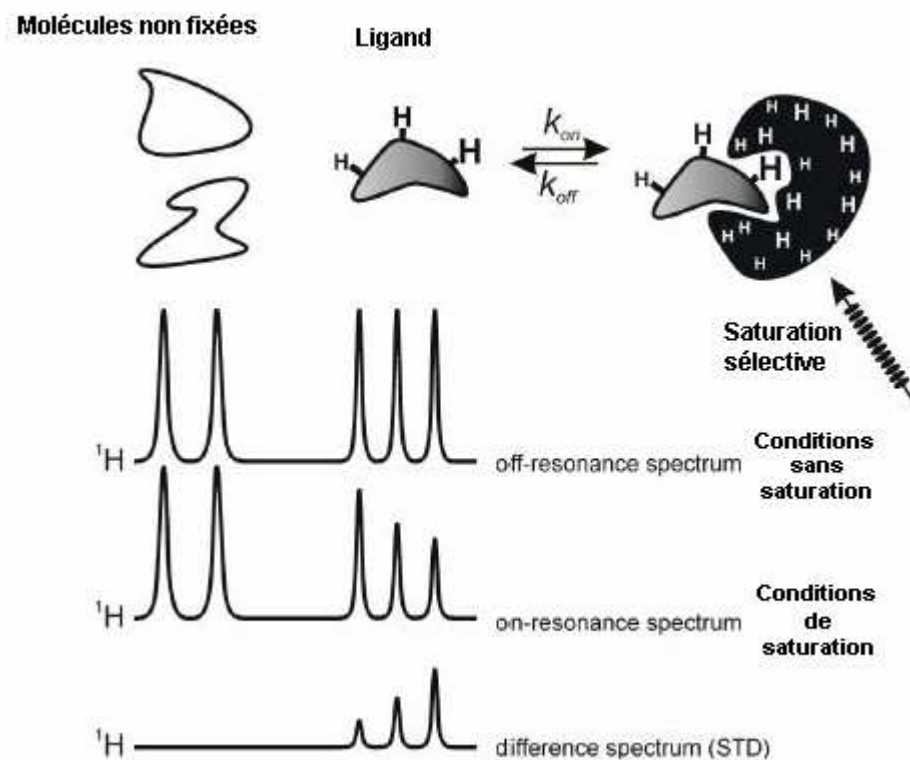


Figure 31. Principe de la méthode de STD-NMR (Neubacher et al., 2006). La protéine est saturée de manière sélective et l'effet de saturation est rapidement propagé aux atomes du ligand en interaction. La soustraction du spectre de saturation (on-résonance) au spectre de référence (off-résonance) conduit au spectre de différence STD sur lequel apparaissent les signaux des protons du ligand en contact avec l'enzyme.

L'étude de STD-NMR a été réalisée par Hervé Meudal et Céline Landon (équipe de Françoise Vovelle, CBM, Orléans) avec un spectromètre de 600 MHz de la marque Varian équipé d'une sonde à triple résonance et de gradients sur l'axe z. Les échantillons (650 µL) contiennent les différents ligands (UDP-Gal, UDP-GlcNAc, UDP-GalNAc, UDP-GalNAc 4 désoxy, UDP-GalNAz ou UDP-GalNHCOCH₂Cl (0,9-1,1 mM)) et la protéine ppGalNAc-T1 (0,012 mM, 500 µg) dans du tampon Tris-DCl pH 7,4 (20 mM) avec 10 mM de NaCl et 1 mM de CdCl₂. Toutes les solutions ont été préparées dans l'eau deutérée pour diminuer au maximum le signal parasite de l'eau. La séquence STD est une séquence 1D incorporant une impulsion de saturation et un filtre T_{1ρ}. La saturation est réalisée à 0,5 et 25 ppm par une implusion de 40 pulses Gaussiens de 50 ms pour donner un temps total de saturation de 2s et un filtre T_{1ρ} de 10 ms est appliqué pour éliminer le signal parasite provenant de la protéine. Pour obtenir un rapport signal sur bruit correct, les spectres STD-NMR sont accumulés pendant 4h (2k scans). Ils ont été réalisés avec une largeur spectrale de 5500 Hz et 16k points de données. Pour tous les ligands, les spectres 1D proton de référence ont été acquis dans les mêmes conditions avec un nombre d'accumulation de 32. De plus, les spectres ¹H-¹H COSY, ¹H-¹H TOCSY, ¹H-¹³C HSQC et ¹H-¹³C HMBC ont été réalisés pour attribuer tous les signaux.

Caractérisation RMN de l'UDP, des UDP-sucres commerciaux utilisés en STD-NMR et du GalNAc-1-P : la calibration a été effectuée sur le signal résiduel de l'eau. (sup = signaux superposés).

	UDP-Gal	UDP-GlcNAc	UDP-GalNAc	GalNAc-1-P	UDP
proton	ppm (25°C)	ppm (5°C)	ppm (5°C)	ppm (5°C)	ppm (5°C)
1	5,53	5,14	5,16	5,01	-
2	3,70	3,61	3,87	3,80	-
3	3,80	3,43 (sup)	3,58	3,56 ; 3,58	-
4	3,91	3,17	3,65	3,62	-
5	4,06	3,55	3,81 (sup)	3,83	-
6	3,64, 3,61	3,49, 3,43 (sup)	3,36 ; 3,38	3,36 ; 3,40	-
1'	5,87	5,61	5,61	-	5,58
2'	4,26 sup	3,99 sup	3,99 sup	-	4,02 sup
3'	4,26 sup	3,99 sup	3,99 sup	-	4,02 sup
4'	4,17	3,91	3,91	-	3,88 sup
5'	4,14, 4,10	3,87, 3,83	3,81 (sup)	-	3,88 sup
5''	5,85	5,58	5,57	-	5,58
6''	7,84	7,61	7,59	-	7,60
NCOR	-	1,70	1,70	1,69	-

Pour chaque ligand testé, on obtient donc un spectre de référence 1D et un spectre STD comme illustré figure 32 pour le composé **19**. Les protons du ligand les plus impliqués dans l'interaction sont ceux pour lesquels l'intensité du pic se rapproche le plus de celle observée sur le spectre 1D. En évaluant le rapport d'intensités entre les deux spectres pour chaque signal, on peut déterminer la proximité relative des protons vis-à-vis de la protéine.

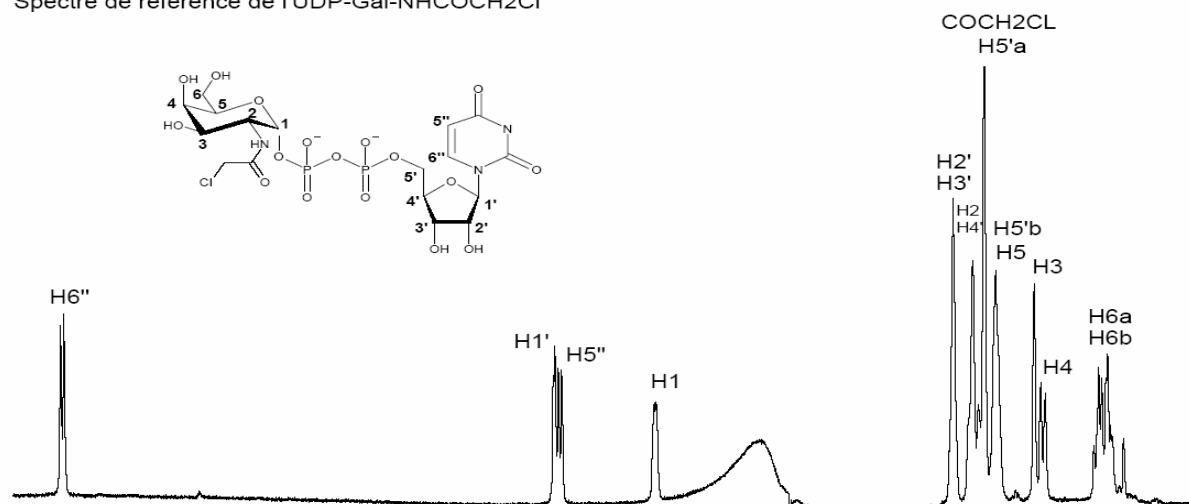
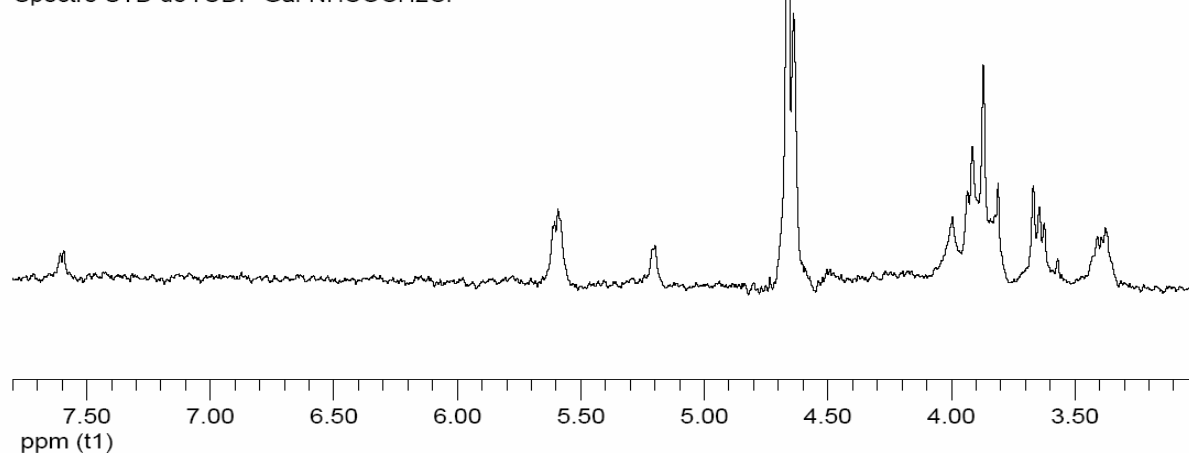
Spectre de référence de l'UDP-Gal-NHCOCH₂ClSpectre STD de l'UDP-Gal-NHCOCH₂Cl

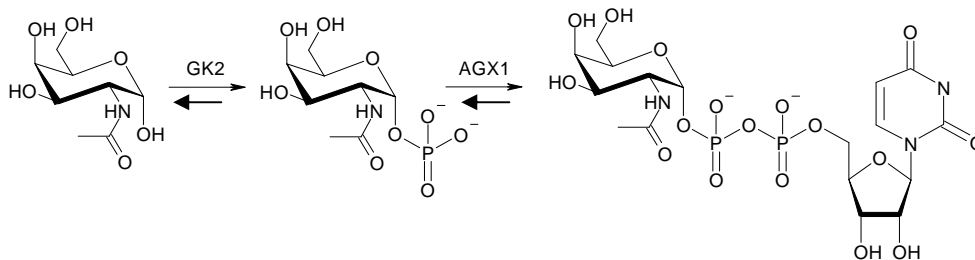
Figure 32. Exemple d'analyse STD-NMR pour le ligand UDP-GalNHCOCH₂Cl. Les échantillons sont analysés à 5°C en présence de ppGalNAc-T1, de Cd²⁺, de NaCl dans une solution tamponnée de Tris-DCl pH 7,4. Les spectres de référence et le spectre STD sont représentés.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

I. SYNTHÈSE DU NUCLÉOTIDE-SUCRE UDP-GalNAc

La stéréospécificité de la liaison glycosidique et la polyfonctionnalité des sucres rendent la synthèse chimique de l'UDP-GalNAc fastidieuse et très peu rentable. La synthèse enzymatique de ce composé n'a jusqu'alors guère été plus performante. Le peu d'exemples décrits dans la littérature montrent les difficultés rencontrées pour purifier les produits et déplacer les réactions dans le sens souhaité.

Dans le souci d'obtenir des quantités substantielles d'UDP-GalNAc, nous avons développé une méthode efficace de production qui combine l'action de trois enzymes GK2, AGX1 et PPA. L'enzyme GK2 de mammifère catalyse la phosphorylation du GalNAc utilisant l'ATP comme source de phosphate. Ensuite, l'enzyme AGX1 également d'origine mammifère utilise l'UTP pour convertir le GalNAc-1-P en UDP-GalNAc.



La PPA de levure déplace la réaction dans le sens souhaité en hydrolysant le sous-produit (PPi). Les deux enzymes GK2 et AGX1 n'étant pas commerciales, une première étape a consisté à les produire de manière recombinante chez *E.coli*.

I.1. Optimisation de la production des enzymes recombinantes

La première année de cette thèse a été consacrée à la production des enzymes nécessaires à l'obtention d'UDP-GalNAc. Notamment, la GalNAc kinase GK2 a nécessité de nombreuses étapes d'optimisation. Une première construction limitée à la taille de la protéine (50 kDa) et que nous appellerons « GK court » a été réalisée à partir de l'ADNc humain. Différentes conditions de culture (température et milieu de culture) ont été testées sur deux souches bactériennes *E.coli*. Dans chacun des cas, la protéine formée se trouvait insolubilisée sous forme de corps d'inclusion ce qui ne permettait pas son extraction par lyse douce. Afin de rendre la protéine plus soluble, une seconde construction plasmidique a été réalisée (forme longue). Cette construction de 57 kDa est composée de la séquence entière de la protéine

RÉSULTATS ET DISCUSSION

supplémentée d'une partie à caractère hydrophile (située en C-ter) provenant du vecteur pTrcHisB utilisé pour le clonage. Le Western-blot A de la figure 33 réalisé grâce à l'étiquette 6His des constructions montre la différence d'extraction entre les deux formes protéiques. L'extraction de la forme courte est représentée par les travées 2,3 et 4. La lyse forte en SDS (2) constitue un témoin de la quantité protéique totale qui peut être extraite. Le culot (3) et le surnageant (4) d'extraction après lyse douce indiquent effectivement que toute la protéine reste dans le culot. En revanche, pour la forme longue, la lyse forte (6) et le surnageant après lyse douce (7) témoignent de la quantité non négligeable de protéine extraite dans ces conditions.

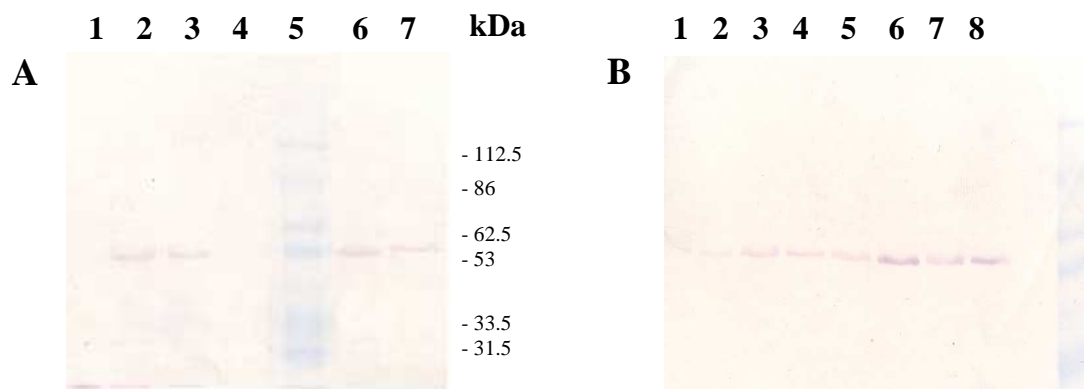


Figure 33. Analyses Western-blot avec Anti-6His de deux formes protéiques de l'enzyme GK2 humaine exprimée chez *E.coli*. **A** : Puits 1, lyse forte des cellules sans vecteur ; Puits 2, lyse forte des cellules transformées avec la forme courte ; Puits 3, culot de lyse douce des cellules transformées avec la forme courte; Puits 4, surnageant de lyse douce des cellules transformées avec la forme courte; Puits 6, lyse forte des cellules transformées avec la forme longue ; Puits 7, surnageant de lyse douce des cellules transformées avec la forme longue. **B** : Puits 1 à Puits 8 : surnageants de lyse douce des cellules transformées avec la forme longue et cultivées dans différentes conditions.

C'est donc la forme longue de GK qui semble la plus aisée à produire. A partir de cette forme protéique, une étude d'optimisation de la production a été réalisée en tenant compte des cinq paramètres que nous avons jugés les plus cruciaux à savoir la température, la DO atteinte à l'induction, la DO atteinte à l'arrêt de la culture (DO finale), le milieu de culture et la concentration en inducteur (IPTG). Pour pouvoir étudier tous ces paramètres, il faudrait envisager 2^5 soit 32 expériences. La mise en place d'un plan d'expérience (Goupy, 1988) nous permet de réduire le nombre d'essais à 16. Ces expériences ont été réalisées par Adélaïde Leveau dans le cadre d'un stage de BTS. Dans cette méthodologie du plan d'expérience, les différents paramètres testés doivent prendre deux niveaux (un niveau inférieur et un niveau supérieur). Ainsi, les deux températures choisies ont été 15°C et 37°C, les cultures ont été réalisées en milieux riches (SOB ou LB) en présence de 0,5 ou 1 mM

RÉSULTATS ET DISCUSSION

d'IPTG. L'ajout de l'inducteur s'est faite à deux stades de la phase exponentielle (DO = 0,5 et DO = 1) et les cultures ont été arrêtées à différents temps correspondant à des biomasses plus ou moins importantes. Sur le Western-blot B de la figure 33 sont représentés les 8 premiers essais de ce plan d'expérience dont les conditions sont réunies dans le tableau 3. On voit par exemple très nettement sur le Western blot que les conditions de l'essai 6, 7 et 8 sont les plus favorables. Grâce au logiciel Image Quant, l'intensité des bandes apparaissant sur le Western-blot a pu être quantifiée puis comparée (Tableau VI). Pour chaque paramètre, on peut calculer la valeur du contraste, constante qui représente l'effet du paramètre sur la production en tenant compte des interactions éventuelles entre les différents paramètres testés (voir matériel et méthodes).

Essai	T	DO induction	DO finale	Milieu	IPTG (mM)	Intensité relative de la bande extraite (UA)
1	15°C	0,56	1,55	SOB	1	7,34
2	37°C	0,59	1,5	LB	0.5	4,895
3	15°C	0,96	2,9	LB	1	10,54
4	37°C	1,1	1,61	SOB	0.5	8,23
5	15°C	0,53	3,3	LB	0.5	11,77
6	37°C	0,53	3,3	SOB	1	23,75
7	15°C	1	3,2	SOB	0.5	16,39
8	37°C	0,95	2,9	LB	1	17,09
Contrastes (L)	0,99	0,56	4,75	-1,43	2,18	-

Tableau VI. Matrice d'expérience des 8 premiers essais du plan d'expérience. Les valeurs des différents paramètres ainsi que l'intensité relative des bandes extraites évaluée par Image Quant sur le Western-blot y sont précisées. Ces données permettent de calculer les valeurs de contraste pour chaque paramètre.

Les interactions d'ordre 3 (interactions entre 3 facteurs) ont été négligées. Compte tenu de l'erreur d'estimation sur l'intensité des bandes, on peut considérer que tout contraste de valeur absolue inférieure à 2 est nul. Ainsi, il apparaît que la température, la DO atteinte au moment de l'induction ainsi que la nature du milieu de culture ne sont pas des facteurs influents. Par contre les deux autres paramètres (biomasse récupérée et concentration en inducteur) semblent être importants et plus particulièrement la biomasse récupérée si on en juge par la valeur du contraste, mais on ne peut pas être catégorique tant que l'on ne sait rien des interactions entre les facteurs. Une seconde série d'essais permet de lever l'ambiguïté et de déterminer les conditions idéales pour la production. Ce plan complémentaire permet avec le plan initial, de calculer les effets principaux (tableau VII).

Essai	T	DO induction	DO finale	Milieu	IPTG (mM)	Intensité relative de la bande extraite (UA)
1	15°C	0,59	2,2	SOB	0,5	12,06
2	37°C	0,53	1,67	LB	1	7,095
3	15°C	1,09	3,3	LB	0,5	10,95
4	37°C	0,97	1,55	SOB	1	7,56
5	15°C	0,53	3,5	LB	1	8,64
6	37°C	0,74	3,3	SOB	0,5	21,23
7	15°C	1,03	3,6	SOB	1	13,58
8	37°C	1,1	3,3	LB	0,5	7,4
Contrastes (L')	-0,24	-1,19	1,65	-2,54	1,84	-
Moyenne des contrastes (L et L')	0,37	-0,32	3,2	-1,9	2,01	-
Interaction avec le paramètre [IPTG]	1,55	0,55	0,6	0,9	-	-

Tableau VII. Matrice d'expérience de la deuxième série d'essais du plan d'expérience. Les valeurs des différents paramètres ainsi que l'intensité relative des bandes extraites évaluée par Image Quant sur le Western-blot y sont précisées. Ces données permettent de calculer les valeurs de contraste pour chaque paramètre.

D'après la moyenne des contrastes, les deux effets les plus influents sont la DO finale et la concentration en IPTG. L'interaction entre ces deux facteurs est nulle et la meilleure extraction est celle où la DO finale est élevée et la concentration en IPTG est de 1 mM. Le milieu de culture étant moins influent, nous avons choisi le SOB pour lequel on obtient toujours une croissance plus rapide. Une incubation à 37°C, température à laquelle on atteint une DO finale élevée en 5-6h d'incubation (au lieu de 23h à 15°C) est également préférable. La DO d'induction n'ayant pas d'influence, nous avons décidé d'induire le plus rapidement possible (DO 0,5-0,6) avec 1mM IPTG. La production d'AGX a posé moins de problème puisqu'une culture de la forme courte de cette enzyme à 15°C permet d'éviter l'insolubilisation.

Les deux enzymes ont été produites à grande échelle à partir d'un litre de culture et les quantités récupérées ont été suffisantes pour la durée de ma thèse. Dans un premier temps, disposant de ces deux enzymes, nous avons optimisé la production d'UDP-GalNAc et identifié le produit par spectrométrie de masse et par RMN.

I.2. Production et caractérisation du nucléotide sucre UDP-GalNAc

I.2.1. Article I : « Two-step enzymatic synthesis of UDP-N-acetylgalactosamine »

Two-step enzymatic synthesis of UDP-*N*-acetylgalactosamine

Vanessa Bourgeaux, Friedrich Piller and Véronique Piller*

Centre de Biophysique Moléculaire CNRS UPR4301 affiliée à l'Université d'Orléans et à l'INSERM,
rue Charles Sadron, F-45071 Orléans Cedex 02, France

Received 6 June 2005; revised 11 August 2005; accepted 30 August 2005

Available online 3 October 2005

Abstract—UDP-GalNAc has been synthesised with high yield from GalNAc, UTP and ATP using recombinant human GalNAc kinase GK2 and UDP-GalNAc pyrophosphorylase AGX1. Both enzymes have been prepared in one step from 1 L cultures of transformed *Escherichia coli* and the UDP-GalNAc produced has been purified by a simple procedure. The method described is a rapid and efficient means to produce UDP-GalNAc as well as analogues like UDP-*N*-azidoacetylgalactosamine (UDP-GalNAz).

© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

UDP-GalNAc is the donor substrate of many *N*-acetylgalactosaminyltransferases, enzymes which transfer GalNAc from the nucleotide sugar to a saccharide or peptide acceptor. Glycoconjugates synthesised by those enzymes are of particular interest in therapeutic approaches which require the production of blood group or tumour antigens or of glycosaminoglycans.¹ Understanding the precise mechanism of action of *N*-acetylgalactosaminyltransferases would facilitate the production of glycans with GalNAc residues crucial for their biological activity. However, the main limitation to most studies is the limited availability of labelled sugar nucleotides and of sugar nucleotide analogues and derivatives due to the difficulty of their synthesis.

UDP-GalNAc can be prepared in several ways. The pure chemical approach^{2,3} is long, fastidious and yields are low. As an alternative, enzymatic biosynthesis avoids the use of protection and deprotection steps required for chemical synthesis and circumvents the difficulties inherent to the formation of a pyrophosphate bond. One of the enzymatic routes used starts from UDP-GlcNAc which is converted into UDP-GalNAc by a mammalian Gal-4 epimerase.⁴ The main drawback of this method is the rather low yield (30% at the equilibrium) and the difficulty to separate UDP-GalNAc from the excess UDP-GlcNAc. Another biosynthetic route starts from galactosamine and uses yeast moulting galactokinase to form galactosamine-1-phosphate (Gal-

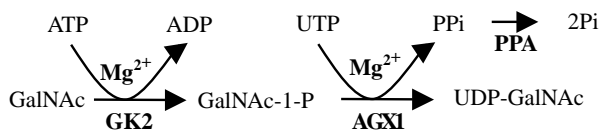
NH₂-1-P) although with low yield.⁵ Then the GalNH₂-1-P is purified and can be coupled to UDP chemically² or enzymatically⁶ using a yeast UDP-Glc uridylyltransferase. In both cases, the UDP-GalNH₂ formed has still to be chemically *N*-acetylated and moderate overall yields, not exceeding 20% of the starting product, are obtained after purification. Another chemoenzymatic synthesis was reported from UMP, sucrose, and GalNH₂-1-P through the help of seven enzymes and two cofactors and a final step of *N*-acetylation.⁷ Besides the requirement of many enzymes, the overall yield was only 34%. Finally, an enzymatic method using a partially purified GalNAc kinase (GK2) from pig kidney allowed GalNAc-1-P formation with good yield.⁸ But the subsequent use of a bacterial GlcNAc pyrophosphorylase (GlmU) with a poor specificity for GalNAc-1-P gave only 10% UDP-GalNAc.

In order to obtain substantial amounts of UDP-GalNAc, we developed a new low-cost strategy easier and more efficient than the previous ones. Starting from GalNAc, ATP and UTP we combined the activities of three enzymes. The mammalian GK2 catalyses the phosphorylation of GalNAc using ATP as phosphate donor. Then, the mammalian UDP-GalNAc pyrophosphorylase (AGX1) uses UTP to convert GalNAc-1-P into UDP-GalNAc. Yeast inorganic pyrophosphatase (PPA) drives UDP-GalNAc production forward (Scheme 1) by preventing the reverse reaction.

While PPA is commercially available, the two other enzymes have been produced by bioengineering. GK2 of human or porcine origin had been previously extracted

Keywords: UDP-GalNAc; Enzymatic synthesis.

* Corresponding author. Tel.: +33 238 257 643; fax: +33 238 257 807; e-mail: pillere@cnrs-orleans.fr



Scheme 1. Two-step enzymatic synthesis of UDP-GalNAc.

from tissues or expressed in *Saccharomyces cerevisiae*.^{9–11} In this study, we expressed the GK2 of human origin in *Escherichia coli* as a tagged protein which allows its rapid and efficient purification. For AGX1, previous studies had established that addition of a tag to the recombinant form of the enzyme reduced its activity and expression without tag imposed the use of several protein purification steps.^{12–14} Here, we describe the expression of AGX1 in *E. coli* as a tagged protein which is as active as the enzyme isolated from tissues and which was easily purified through its tag.

Both cDNAs encoding the enzymes GK2 and AGX1 were cloned into a high expression plasmid, the proteins were expressed in *E. coli* and purified by Ni-NTA affinity chromatography.¹⁵ SDS-PAGE (Fig. 1) and Western blot analysis (not shown) confirmed that the main proteins obtained after purification were the expected ones with an apparent molecular weight of 57 kDa for GK2 and of 61 kDa for AGX1. From 1 L cultures we obtained 2.2 mg GK2 (82% purity) and 3.4 mg AGX1 (70% purity).

Enzymatic assays¹⁶ indicated that the specific activities of the recombinant enzymes and the K_m values for substrates were close to those described in the literature^{10,12,13} for the enzymes purified from tissues (Table 1). Both enzymes were kept at 0.5 mg/mL in a buffered (pH 7.5) solution containing 30% glycerol and showed no loss of activity after one year at $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

The purified GK2 and AGX1 enzymes were used to synthesise in one-pot UDP-GalNAc from GalNAc, ATP and UTP. Small-scale assays were first performed to optimise the reaction.¹⁷ The reaction catalysed by AGX1 being reversible, addition of PPA was necessary to drive the synthesis in the forward direction and to reach maximum yield ($68 \pm 10\%$) after ion exchange

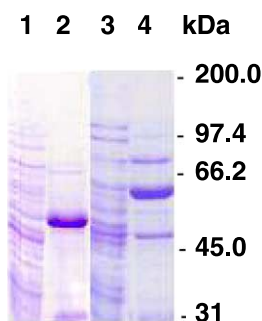


Figure 1. Coomassie-stained gel after SDS-PAGE of the soluble proteins extracted from transformed bacteria by gentle lysis (lanes 1 and 3) and purified on Ni-NTA resin (lanes 2 and 4). Lanes 1 and 2: GK2; lanes 3 and 4: AGX1.

Table 1. K_m of the recombinant enzymes

	K_m (mM)	Specific activity (nmol/ $\mu\text{g}/\text{min}$)
GK2	0.22 (0.14) ¹⁰	1.80 (1.40) ¹⁰
AGX1	0.67 (1.1) ¹²	29.0 (14.9) ^{12,13}

Values from the literature are in parentheses.

chromatography. The optimal quantity of PPA was determined to be 2 U/mL. Another adjustment was necessary due to the difference in K_m values (Table 1). Experiments presented in Figure 2 indicate that the optimal concentration of GalNAc engaged in the mixture is 3 mM. In addition, we determined optimal quantities of enzymes for maximal formation of UDP-GalNAc in 6 h: 0.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AGX1 and 6.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ GK2.

Finally, we evaluated optimal concentrations of other substrates and found out that 3 mM GalNAc, 3 mM ATP and 3 mM UTP were the lowest concentrations required to obtain after purification maximal amounts of UDP-GalNAc. Apparition kinetics of UDP-GalNAc under those conditions are presented in Figure 3. A 2 mL production of UDP-GalNAc was performed starting from 1.33 mg GalNAc.¹⁸ Both purified enzymes were incubated with substrates, necessary cofactors and PPA for 6 h. After a two-step purification by ion exchange and gel filtration, the pure desired product, UDP-GalNAc ammonium salt, was characterised by mass spectrometry and NMR spectroscopy.¹⁹

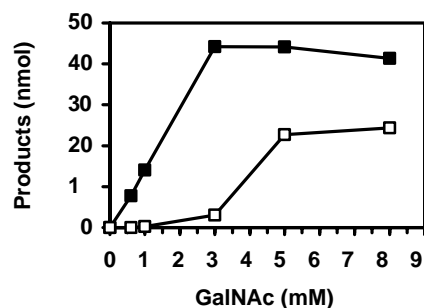


Figure 2. Kinetics of GalNAc-1-P (open squares) and UDP-GalNAc (filled squares) production as a function of GalNAc concentration.

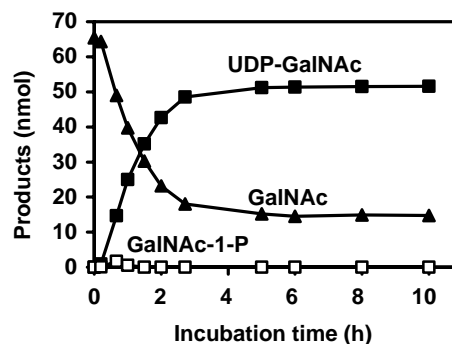


Figure 3. Time kinetics of UDP-GalNAc (filled squares) and GalNAc-1-P (open squares) formation and of GalNAc consumption (triangles).

In order to test whether this enzymatic synthesis was applicable to GalNAc derivatives, we chose *N*-azidoacetylgalactosamine (GalNAz)²⁰ as starting substrate since it was recently used to enable the detection in the cells of mucin type GalNAc-bearing glycoproteins.²¹ First, we determined the K_m of GK2 for GalNAz to be 0.50 mM,¹⁶ a value in the same order of magnitude as for GalNAc (0.22 mM). Under the conditions described above¹⁸ GalNAz was very efficiently converted into UDP-GalNAz (99% yield). Previous studies had suggested²¹ that GalNAz was processed in cells by the hexosamine salvage pathway enzymes.¹¹ Here, we provide evidence that GalNAz and GalNAz-1-P, respectively, are substrates for GK2 and AGX1 *in vitro*.

The paper describes an efficient method for the enzymatic synthesis of UDP-GalNAc (68 ± 10%) from the inexpensive substrates GalNAc, ATP and UTP. With the amount of enzymes isolated after 1 L *E. coli* cultures, it is possible to obtain up to 500 mg of UDP-GalNAc. The method proposed here was also successfully employed on GalNAz, showing that both GK2 and AGX1 can accept substrates with modified *N*-acetyl groups. Surprisingly, GalNAz appeared to be an excellent substrate for the three-enzyme system. Considering the K_m value of GK2 for GalNAz and the high specificity of this enzyme for GalNAc, AGX1 must be responsible for the high conversion into UDP-GalNAz suggesting a broad acceptance for this latter enzyme. Procedures using the same enzymatic system for the synthesis of other UDP-GalNAc analogues are currently under investigation. The same efficient method was also applied to the synthesis of radioactive UDP-GalNAc, a very useful substrate for enzymatic tests of *N*-acetylgalactosaminyltransferases and which is no longer commercially available. By this procedure we have produced [³H]-labelled UDP-GalNAc with the same overall yield using [³H]GalNAc. It is noteworthy that the method presented here offers, for the synthesis of radioactive UDP-GalNAc, an appreciable alternative to a pure chemical approach.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Ligue Nationale contre le Cancer (comités départementaux du Loiret et du Loir et Cher), the Centre National de la Recherche Scientifique: Protéomique et Génie des Protéines and by the Groupement de Recherche: Génomique et Génie des Glycosyltransférases. The award of a fellowship to V.B. by the Région Centre and the CNRS is gratefully acknowledged. The authors wish to thank N. Bureaud for expert technical assistance, C. Buré for MS spectra and H. Meudal for NMR spectra.

References and notes

- Varki, A.; Cummings, R.; Esko, J.; Freeze, H.; Hart, G.; Marth, J. In *Essentials of Glycobiology*; Cold Spring Harbor Lab Press: New York, 1999.
- Moffat, J. G.; Khorana, H. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 3756.
- Lazarevic, D.; Thiem, J. *Carbohydr. Res.* **2002**, *337*, 2187.
- Piller, F.; Eckhardt, A. E.; Hill, R. L. *Anal. Biochem.* **1982**, *127*, 171.
- Carlson, D. M.; Swanson, A. L.; Roseman, S. *Biochemistry* **1964**, *47*, 402.
- Heidlas, J.; Lees, J. W.; Whitesides, G. M. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 152.
- Bülter, T. C. W.; Elling, L. *Carbohydr. Res.* **1997**, *305*, 469.
- Suntharankar, P.; Pastuszak, I.; Rooke, A.; Elbein, A. D.; van de Rijn, I.; Canfield, W. M.; Drake, R. R. *Anal. Biochem.* **1998**, *258*, 195.
- Lee, R. T.; Peterson, C. L.; Calman, A. F.; Herskowitz, I.; O'Donnell, J. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1992**, *89*, 10887.
- Pastuszak, I.; Drake, R.; Elbein, A. D. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 20776.
- Pastuszak, I.; O'Donnell, J.; Elbein, A. D. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 23653.
- Szumilo, T.; Zeng, Y.; Pastuszak, I.; Drake, R.; Szumilo, H.; Elbein, A. D. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 13147.
- Wang-Gillam, A.; Pastuszak, I.; Elbein, A. D. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 27055.
- Peneff, C.; Ferrari, P.; Charrier, V.; Taburet, Y.; Monnier, C.; Zamboni, V.; Winter, J.; Harnois, M.; Fassy, F.; Bourne, Y. *Embo J.* **2001**, *20*, 6191.
- DNAs encoding human GK2 and AGX1 were obtained from Open Biosystems. The complete coding sequences were amplified by PCR in order to create *Bam*HI restriction sites in 5' and 3' ends of both inserts. For GK2 the primers used were 5'GGATCCAATGGCTACAGAGAGCCCTG3', sense and 5'GGATCCGGCCTCAAGCAAACCC3', antisense. For AGX1 the primers used were 5'CGGGATCCAATGAACATTAATGACCTCAAACCTCCG3', sense and 5'GCGGATCCTCAAATACCATTTTTCACCAGCTCATG3', antisense. The PCR products were digested by *Bam*HI, purified and ligated into a similarly digested pTrcHisB vector (Invitrogen). The resulting plasmids were used to transform *E. coli* ER 2566 (NEB) for GK2 and RosettaTM (Novagen) for AGX1. Selected clones were grown in SOB medium at 37 °C for GK2 and 15 °C for AGX1 until the OD 600 nm reached 0.5–0.8. Then, recombinant protein syntheses were induced by addition of 0.5 mM (for AGX1) or 1 mM (for GK2) IPTG and cells were allowed to grow for an additional 5 h for GK2 and 23 h for AGX1. The pellets obtained after centrifugation were lysed in 2.5 mL/g pellet Y-PER plusTM (Pierce) containing 1 mM PMSF, 5 µg/mL DNase, 10 µg/mL RNase, and 0.5 mM DTT. After shaking at room temperature for 20 min and centrifugation, a second extraction was performed on the pellets. 6His-tagged recombinant proteins recovered in the lysis supernatants were isolated by affinity chromatography on Ni-NTA superflow beads (Qiagen) after a 3-fold dilution in 50 mM sodium phosphate, pH 8.0, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, and 0.5 mM DTT (buffer A). After incubating for 2 h with the beads at 4 °C and three washes with buffer A, the proteins were eluted with 250 mM imidazole, pH 7.0, 0.5 mM DTT.
- GK2 assays: unless otherwise stated, all products were purchased from Sigma–Aldrich. Reaction mixtures (25 µL) contained [³H]GalNAc (American Radiolabeled Chemicals) adjusted to 1 mM and 1300 cpm/nmol, 5 mM ATP, 5 mM MgCl₂, 0.1 g/100 mL (0.1%) BSA and various amounts of GK2 in 75 mM Tris–HCl, pH 8.8. After 15 min at 37 °C, samples were diluted with 700 µL water/methanol 50:50 and applied to a 0.5 mL DOWEX 1 × 8

- anion exchange column. The column was washed with 25 mM NH_4HCO_3 (3×1.5 mL) to remove unbound material, and then GalNAc-1-P was eluted with 250 mM NH_4HCO_3 (3×1.5 mL). All fractions were analysed by scintillation counting. For GalNAc-1-P preparation, the same protocol as above was scaled up to 23 mL with nonradioactive GalNAc; after DOWEX, fractions were pooled, concentrated and applied to a gel filtration column on G10 Sephadex (Amersham) gel (60 mL, flow rate 30 mL/h) before NMR analysis: GalNAc-1-P (53%, 3.59 mg). ^1H NMR (500 MHz, D_2O) δ : 5.46 (dd; 1H; $J_{\text{H-1,P}} = 7.5$; $J_{1,2} = 3.5$; H-1); 4.205 (ddd; 1H; $J_{2,3} = 11.0$; $J_{2,\text{P}} = 2.3$; H-2); 4.155 (ddd; 1H; $J_{5,6a} = 7.5$; $J_{5,6b} = 5.1$; H-5); 4.04 (d; 1H; $J_{4,3} = 3.0$; H-4); 3.96 (dd; 1H; $J_{3,2} = 11.0$; $J_{3,4} = 3.0$; H-3); 3.785 (dd; 1H; $J_{6a,6b} = 11.9$; $J_{6a,5} = 7.5$; H-6a); 3.745 (dd; 1H; $J_{6b,6a} = 11.8$; $J_{6b,5} = 5.0$; H-6b); 2.09 (s; 3H; CH₃). For K_m calculation, 70 ng of GK2 was used with 5 mM ATP and various amounts of GalNAc from 25 μM to 1400 μM in 25 μL total volume. The same method was used with GalNAz but with [^{32}P]ATP (Amersham). All assays were performed in triplicate. AGX1 assays: reaction mixtures (25 μL) contained [^3H]UTP (ARC) adjusted to 4 mM and 250 cpm/nmol, 5 mM GalNAc-1-P, 5 mM MgCl_2 , 0.1% BSA and various amounts of AGX1 in 75 mM Tris-HCl pH 8.8. After 30 min at 37 °C, the samples were diluted with water/methanol 50:50 and applied to DOWEX 1 \times 8 as described for GK2, except that UDP-GalNAc was eluted with 300 mM NH_4HCO_3 (10×1.5 mL) and non-reacted UTP with 1 M NH_4HCO_3 . All fractions were analysed by scintillation counting. For K_m calculations, 1.6 μg of enzyme was used with 4 mM UTP and various amounts of GalNAc-1-P from 0.275 mM to 6.6 mM in 25 μL total volume. All assays were performed in triplicate.
17. Combined GK2-AGX1 assays: optimisation tests were performed at 37 °C. Reaction mixtures (25 μL) contained [^3H]GalNAc (3 mM, 50 cpm/nmol), 5 mM ATP, 4 mM UTP, 5 mM MgCl_2 , 0.1% BSA, yeast PPA (0.05 U) and various amounts of GK2 and AGX1 in 75 mM Tris-HCl, pH 8.8. After 2 h, samples were diluted with water/methanol 50:50 and applied to DOWEX 1 \times 8, the column washed with 25 mM NH_4HCO_3 (3×1.5 mL) to remove unbound material, non-reacted GalNAc-1-P was eluted with 100 mM NH_4HCO_3 and UDP-GalNAc with 300 mM NH_4HCO_3 .
 18. For UDP-GalNAc synthesis a 2 mL reaction mixture contained 3 mM GalNAc, 3 mM UTP, 3 mM ATP, 5 mM MgCl_2 , 0.1% BSA, GK2 (12 μg), AGX1 (1.6 μg) and PPA (4 U) in 75 mM Tris-HCl, pH 8.8. The reaction was left at 37 °C for 6 h, stopped by addition of methanol/water 50:50 (13 mL) and applied to DOWEX 1 \times 8 (4 mL). After extensive washing first with 25 mM then with 100 mM NH_4HCO_3 , UDP-GalNAc was eluted with 300 mM NH_4HCO_3 . After evaporation, the sample was applied to a gel filtration column as described in Ref. 16. Detection was performed by absorbance reading at 260 nm.
 19. UDP-GalNAc ammonium salt (68%, 2.62 mg). ^1H NMR (500 MHz, D_2O) δ : 7.96 (d; 1H; $J_{6'',5''} = 8.1$; H-6''); 5.98 (d; 1H; $J_{1',2'} = 4.8$; H-1'); 5.97 (d; 1H; $J_{5'',6''} = 8.1$; H-5''); 5.55 (dd; 1H; $J_{\text{H-1,P}} = 7.3$; $J_{1,2} = 3.3$; H-1); 4.45–4.3 (m; H-2'; H-3'); 4.3–4.16 (m; H4'; H5'a; H5'b; H2; H5); 4.05 (br d; 1H; $J = 2.1$; H-4); 3.97 (dd; 1H; $J_{3,2} = 10.9$; $J_{3,4} = 3.0$; H-3); 3.78 (dd; 1H; $J_{6a,6b} = 11.8$; $J_{6a,5} = 7.3$; H-6a); 3.73 (dd; 1H; $J_{6a,6b} = 11.8$; $J_{6b,5} = 5.2$; H-6b); 2.09 (s; 3H; CH₃); MS (ESI): (M+H)⁺, 608.13; (M+NH₄)⁺, 625.25; (M+Na)⁺, 630.5; (M+K)⁺, 646.00.
 20. GalNAz was synthesised according to Ref. 21. For UDP-GalNAz formation, the same conditions were used as for UDP-GalNAc.¹⁸ UDP-GalNAz was characterised directly from the 25 μL reaction mixture after protein precipitation in MeOH/H₂O 50:50 by mass spectroscopy. MS (ESI): (M–H)[–] 647.08.
 21. Hang, H. C.; Yu, C.; Kato, D. L.; Bertozzi, C. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *100*, 14846.

I.2.2. Synthèse de [¹⁴C] UDP-GalNAc

Malgré le danger et les contraintes de manipulation liés à l'emploi de composés radioactifs, les chercheurs continuent d'y avoir recours n'ayant pas trouvé d'alternative aussi sensible pour les études enzymologiques (suivi de réaction, calcul de constantes cinétiques) ou encore pour le marquage moléculaire. La synthèse de composés radioactifs est difficile à réaliser par voie chimique : d'une part parce que les rendements sont faibles et que la synthèse chimique nécessite de nombreuses étapes ce qui est peu compatible avec les précautions de sécurité à prendre lorsque l'on manipule de tels produits; d'autre part parce que les produits radioactifs commerciaux contiennent très peu de matériel (de l'ordre de 500 µg) et si l'on souhaite conserver une radioactivité spécifique élevée, les méthodes classiques de chimie ne permettent pas de travailler avec des quantités aussi faibles. En revanche, la synthèse chimio-enzymatique est bien adaptée à ce type de situation. La catalyse enzymatique permet en effet de travailler avec des quantités infimes de produit et d'obtenir en peu d'étapes le composé d'intérêt dans la conformation souhaitée. Le [¹⁴C] UDP-GalNAc n'étant depuis peu plus commercialisé, j'ai réalisé, pour mes besoins et ceux d'une autre équipe travaillant sur les GalNAc transférases, la synthèse du nucléotide sucre UDP-GalNAc radiomarké selon la méthode décrite dans le chapitre précédent.

I.2.2.1. Optimisation de la production de GalNAc ¹⁴C

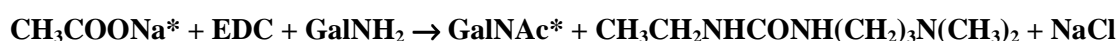
Le [¹⁴C] GalNAc n'étant pas un produit disponible dans le commerce, nous avons dû synthétiser chimiquement ce précurseur radiomarké. Compte tenu du prix élevé de la galactosamine radiomarkée, nous avons décidé de prendre de la galactosamine non marquée et d'introduire la radioactivité par l'agent de *N*-Acétylation qui doit donc contenir un carbone 14 sur le groupement Acyle. Toujours dans un souci économique, nous avons testé différentes conditions « à froid » pour la *N*-Acétylation (tableau VIII). Tous les essais ont été réalisés dans un mélange réactionnel de 1 mL.

La synthèse de GalNAc en deux étapes (essai 1) utilisant le chlorure d'oxalyl pour générer le chlorure d'acétyle ainsi que l'essai 5 utilisant un mélange EDC/NHS donnent de très mauvais rendements (< 15%). En revanche, la *N*-acétylation réalisée avec l'anhydride acétique, le chlorure d'acyle en milieu organique ou encore l'acétate de sodium en présence d'EDC donne des rendements satisfaisants. Bien que l'on atteigne 72% de rendement avec l'essai 2, nous n'avons pas retenu cette méthode car l'emploi d'anhydride acétique radiomarké oblige à « jeter » 50% de la radioactivité.

Réactifs				Solvant (1 mL)	Conditions	Rdmt	RMN
Essai 1	CH ₃ COONa	CICOCOCl	-	THF	2h RT	9 %	-
	CH ₃ COCl	GalNH ₂	Pyridine	H ₂ O	3h RT		
Essai 2	(CH ₃ CO) ₂ O	GalNH ₂	Dowex 1*8 HCO ₃ ⁻	H ₂ O/MeOH	1h30 0°C	72 %	propre
Essai 3	CH ₃ COCl	GalNH ₂	TEA	DMF/MeOH/THF	2h RT	46 %	DMF
Essai 4	CH ₃ COONa	GalNH ₂	EDC	H ₂ O 100 mM MES pH 6	6h30 RT	31 %	8 % GalNH ₂
Essai 5	CH ₃ COONa	GalNH ₂	EDC/NHS	H ₂ O 100 mM MES pH 6	6h30 RT	< 15 %	-

Tableau VIII. Différentes conditions opératoires et réactifs de départ pour la synthèse de GalNAc à partir de galactosamine. Pour chacun des essais, le rendement de la réaction ainsi que la pureté évaluée d'après le spectre RMN sont indiqués.

Dans l'essai 3, le mélange n'était pas bien soluble ce qui peut poser problème lors de la reproduction de la synthèse et le spectre RMN montre des traces résiduelles de DMF qui peuvent gêner la réaction enzymatique qui suit. On pourrait éventuellement lyophiliser à plusieurs reprises le produit pour se débarrasser du DMF mais il est plus prudent de réaliser la synthèse le plus rapidement possible. Ainsi, ce sont les conditions de l'essai 4 qui se sont révélées les plus adaptées à cette synthèse. Le spectre RMN indique qu'il reste 8% de GalNH₂ n'ayant pas réagi mais cette impureté sera aisément éliminée lors du couplage enzymatique. L'équation de la première étape de la synthèse d'UDP-GalNAc est donc la suivante :



Afin d'optimiser la réaction, différents essais ont été réalisés à « froid » en faisant varier le pH, le volume réactionnel ainsi que la quantité de galactosamine introduite (Tableau IX). Tous les essais contenaient 14,6 mg d'acétate de sodium (1 eq) et ont été agités pendant 15h à TA.

Réactifs			Solvant		Rdmt
CH ₃ COONa	GalNH ₂ (1,5 eq)	EDC	4 mL	pH 5	12 %
CH ₃ COONa	GalNH ₂ (1,5 eq)	EDC	4 mL	pH 6	13 %
CH ₃ COONa	GalNH ₂ (1,5 eq)	EDC	4 mL	pH 7	20 %
CH ₃ COONa	GalNH ₂ (3 eq)	EDC	4 mL	pH 7	34 %
CH ₃ COONa	GalNH ₂ (1,5 eq)	EDC	1 mL	pH 7	43 %

Tableau IX. Rendements de synthèse obtenus pour la synthèse de GalNAc à partir de galactosamine, d'acétate de sodium et d'EDC à différents pH et différents volumes réactionnels.

L'étude a montré qu'il était préférable de travailler à pH 7 dans un volume minimal de solvant (1 mL) en engageant 1,5 eq de galactosamine. Le produit radioactif de départ (CH_3COONa commercial) ne représente que $400\mu\text{g}$ et on ne peut guère agiter un volume réactionnel de moins de $100\mu\text{L}$. Il faut donc ajouter de l'acétate de sodium froid au produit radioactif pour se placer dans les conditions de synthèse optimales.

1.2.2.2. Couplage enzymatique et purification de l'UDP-GalNAc radiomarqué

La synthèse enzymatique en deux étapes est réalisée dans les mêmes conditions que dans le chapitre précédent sur un volume réactionnel de 2,3 mL. Après avoir précipité les protéines au méthanol, le produit est purifié sur une colonne DOWEX échangeuse d'anions (4,8 mL). Afin de suivre précisément l'élution des produits, $0,6\mu\text{L}$ du mélange réactionnel sont purifiés à part sur une colonne de volume proportionnel et les fractions récupérées sont comptées pour leur teneur en radioactivité. La figure 27 montre le profil d'élution des espèces radiomarquées donc porteuses du monosaccharide GalNAc. Après avoir éliminé le GalNAc résiduel et le GalNAc-1-P sous-produit de la réaction, l'UDP-GalNAc est élué en 300 mM NH_4HCO_3 . L'UTP et l'ATP qui n'ont pas réagi restent fixés à la colonne à cette molarité en sel.

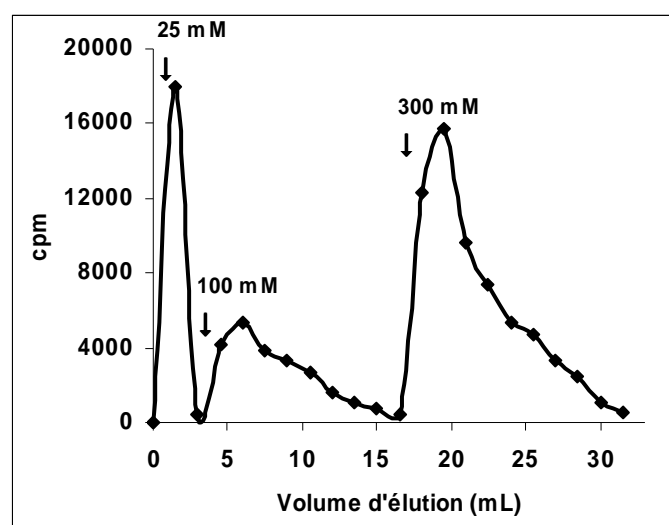


Figure 34. Profil d'élution du mélange réactionnel de synthèse d'UDP-GalNAc sur colonne échangeuse d'anions. L'élution des produits est réalisée avec du bicarbonate d'ammonium

Le produit est ensuite dessalé par gel filtration (G10, rdt = 90 à 95 %). Le rendement global de synthèse calculé sur les trois étapes est estimé à 20%, l'étape limitante étant la synthèse de GalNAc marqué. La radioactivité spécifique du produit est estimée à $14\mu\text{Ci}/\mu\text{mole}$ ce qui reste raisonnable par rapport aux produits anciennement commercialisés. La pureté du produit a été évaluée à 98% par chromatographie sur papier (comptage radioactif) et un dosage

enzymatique avec la ppGalNAc-T1 et le peptide accepteur (STP)₅AG a montré une incorporation similaire au [³H] UDP-GalNAc commercial dont nous possédons encore quelques échantillons.

I.3. Conclusion

Les enzymes GK2 et AGX1 d'origine humaine ont pu être produites dans les bactéries en quantités substantielles compatibles avec de la synthèse chimio-enzymatique. La détermination des caractéristiques et des paramètres cinétiques de ces deux protéines a permis leur utilisation pour synthétiser de l'UDP-GalNAc à partir d'ATP, de GalNAc et d'UTP. L'UDP-GalNAc produit a été purifié en deux étapes et caractérisé par RMN et spectrométrie de masse. Le rendement de synthèse élevé démontre l'efficacité de la méthode enzymatique qui pallie les problèmes de stéréospécificité liés à la synthèse chimique de ce composé et permet en outre d'obtenir le produit radiomarqué.

II. SYNTHÈSE ENZYMATIQUE DE GLYCOCONJUGUÉS

Un grand nombre de transférases utilisent le nucléotide-sucres UDP-GalNAc comme substrat pour greffer des unités monosaccharidiques sur diverses molécules accepteurs comme les polypeptides ou encore les oligosaccharides. Comme nous l'avons déjà mentionné, le coût prohibitif de ce nucléotide-sucres ne permet pas son utilisation pour des productions importantes de glycoconjugués. La méthode développée dans le chapitre précédent qui propose une synthèse efficace de l'UDP-GalNAc peut être étendue à la synthèse de glycoconjugués. D'un point de vue immunologique, l'incorporation d'épitopes Tn sur une cible anti-tumorale telle que (MUC1) est très intéressante. Les carbohydrates sont dans certains cas connus pour augmenter le pouvoir immunogène de la molécule peptidique et ce mélange d'épitopes peptidique et saccharidique fait l'objet de recherches accrues en vaccinologie. Dans le but d'étudier la potentialité de ces molécules pour l'immunité humorale, nous avons mis au point un système multienzymes pour la glycosylation des peptides qui peut aussi s'appliquer à la synthèse d'oligosaccharides.

II.1. Développement du système multienzymatique pour la glycosylation

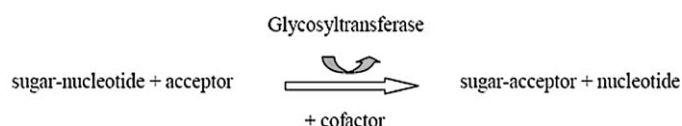
II.1.1. Article II : «Efficient enzymatic glycosylation of peptides and oligosaccharides from GalNAc and UTP » .

DOI: 10.1002/cbic.200600369

Efficient Enzymatic Glycosylation of Peptides and Oligosaccharides from GalNAc and UTP

Vanessa Bourgeaux, Martine Cadène, Friedrich Piller, and Véronique Pillere*^[a]

Carbohydrates play a major role in a variety of biological processes,^[1–5] and synthetic glycoconjugates are increasingly used to study the different roles of glycans in vivo and in vitro.^[6] Several approaches have been developed for their production, ranging from pure chemical to pure enzymatic methods.^[7–13] Large-scale production using only chemical methods is difficult being both long and inefficient because of multiple protection/deprotection steps. Enzymatic synthesis of glycoconjugates is advantageous being fast and gives generally good yields. However, whenever Leloir-type glycosyltransferases are used, large amounts of sugar nucleotides are required. In addition, most of these enzymes are inhibited by the free nucleotide reaction product (Scheme 1).

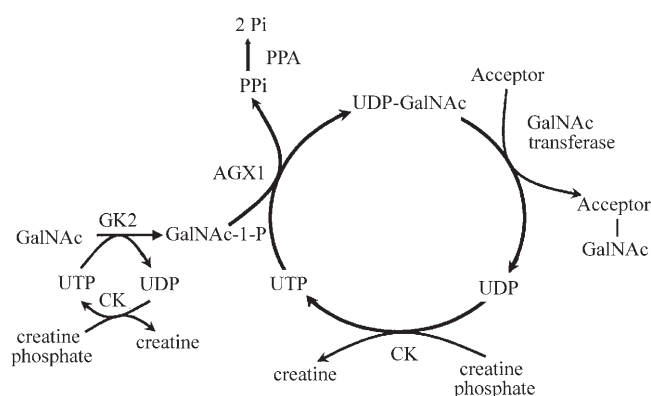


Scheme 1. Glycosylation of an acceptor catalyzed by a glycosyltransferase. The enzyme is specific for both substrates: the sugar nucleotide and the acceptor. Most glycosyltransferases require metal ions as cofactors.

Thus, to improve enzymatic methods involving glycosyltransferases a concomitant regeneration of the sugar nucleotide is needed. In 1982, Wong et al.^[14] developed the first glycosylation cycle with regeneration of UDP-Gal for *N*-acetylglucosamine synthesis. Since, several teams have been working on in vitro regeneration systems of UDP-Gal,^[15–19] UDP-Glc,^[18,20,21] CMP-*N*-acetylneuraminic acid, and GDP-Fuc.^[16] More recently, engineered bacteria or yeasts were developed which allow large scale synthesis of oligosaccharides with the recycling of some of the necessary sugar nucleotides.^[22–25] GalNAc-containing glycoconjugates are among the most thoroughly studied blood group, oncofetal, or bacterial antigens and are in high demand for in vivo studies. In the method described by Shao et al.^[22] UDP-GalNAc regeneration was achieved in a bacterial system employing six enzymes including an epimerase to convert UDP-GlcNAc into UDP-GalNAc. However, such a prokar-

yote-based method does not allow the use of glycosyltransferases which need posttranslational modifications for activity. Here we present a well-defined in vitro synthetic system with purified recombinant enzymes based on the alternative in vivo pathway of UDP-GalNAc biosynthesis^[26,27] which decreases the number of enzymes involved in UDP-GalNAc regeneration from six to four and replaces the less efficient epimerase pathway.

In a previous work we have shown that two recombinant enzymes of human origin could be used for the efficient production of UDP-GalNAc.^[28] The present study employs these enzymes in combination with glycosyltransferases and a UTP-regenerating enzyme for the synthesis of glycopeptides and oligosaccharides starting from GalNAc and catalytic amounts of UTP. In this UDP-GalNAc regenerating cycle (Scheme 2)



Scheme 2. Multiple-enzyme system for in vitro glycosylation with in situ regeneration of UDP-GalNAc.

GalNAc is first phosphorylated by the human GalNAc kinase 2 (GK2) with UTP as phosphate donor. The GalNAc-1-P produced is transformed into UDP-GalNAc by the human UDP-GalNAc pyrophosphorylase (AGX1) also using UTP as substrate. UDP-GalNAc then serves as substrate for different GalNAc transferases which transfer the GalNAc moiety onto peptide or oligosaccharide acceptors. Finally the UDP which is formed during that transfer reaction and during the phosphorylation of GalNAc is regenerated to UTP from creatine phosphate by the rabbit creatine kinase (CK). Since UDP is a potent inhibitor of GalNAc transferases its elimination by conversion to UTP and quickly to UDP-GalNAc greatly improves the glycosylation reaction. A yeast inorganic pyrophosphorylase (PPA) drives the AGX1 reaction forward by hydrolyzing the PPi formed during that step.

First we worked out the conditions allowing the different enzymes to function together optimally. For that purpose, we chose to test the cycle with the recombinant bovine polypeptide: α -*N*-acetylgalactosaminyltransferase T1 (ppGalNAcT1) produced in yeast^[29] and used a synthetic 17 aa peptide with the sequence STPSTPSTPSTPSTPAG ((STP)₅) as an acceptor substrate. AGX1 and GK2 have an optimum pH between 8.5 and 9.0 whereas the other enzymes are most efficient at pH 6.5 to 7.0. In addition, all enzymes require either Mg²⁺ or Mn²⁺ as co-

[a] V. Bourgeaux, Dr. M. Cadène, Dr. F. Piller, Dr. V. Pillere
Centre de Biophysique Moléculaire
CNRS UPR4301 affiliée à l'Université d'Orléans et à l'INSERM
rue Charles Sadron, 45071 Orléans Cedex 02 (France)
Fax: (+33) 238257807
E-mail: pillere@cns-orleans.fr

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://www.chembiochem.org> or from the author.

factor for highest activity. The optimal conditions determined were 75 mM imidazole, pH 7.0, and 5 mM Mn²⁺. Moreover, although the phosphate donor for GK2 is generally ATP, its use was precluded by ATP's inhibitory effect on ppGalNAcTs, leading to poor transfer of GalNAc to the peptide acceptor. We noticed that GK2 uses UTP quite efficiently as phosphate donor and that a catalytic amount (0.2 mM) of UTP in the cycle was sufficient to supply both the GK2 and the AGX1 reactions. The levels of GK2 and AGX1 for the highest glycosylation of (STP)₅ were determined by keeping the other enzymes at saturation levels (as reported in the Supporting Information). Results show that maximum glycosylation of the peptide was reached within 12 h at 37 °C with 12 mU mL⁻¹ of GK2 and 6 mU mL⁻¹ of AGX1 in combination with 2 U mL⁻¹ of PPA, 3 U mL⁻¹ of CK, and 16 mU mL⁻¹ of ppGalNAcT1, and with 3.9 mM GalNAc and 0.2 mM UTP.

The efficiency of the UDP-GalNAc regeneration cycle in glycosylating a peptide was compared with a standard enzymatic glycosylation reaction without regeneration of the donor substrate. Again the ppGalNAcT1 transferase and the acceptor (STP)₅ were used with a twofold excess of commercial UDP-GalNAc (3.6 mM) over the available Ser/Thr acceptor sites, and calf intestine phosphorylase (CIP) was added for the removal of UDP (Table 1). Under those conditions incorporation of 3.9 mol of GalNAc per mol of peptide was obtained after 36 h incubation with addition of fresh enzymes at 16 h. The peptide could also be glycosylated from GalNAc and high levels of UTP (4 mM) in the absence of UTP regeneration. However, the production of glycoconjugate was limited by the inhibitory effect of UDP on ppGalNAcT1 leading to a much lower incorporation (1.2 mol of GalNAc per mol peptide, Table 1). The addition of CK (Table 1) allows the regeneration of UTP and thus completes the enzymatic cycle. Although the concentration of UTP has been lowered to 0.2 mM, the incorporation of GalNAc reached 3.2 mol per mol peptide. The use of pyruvate kinase instead of CK (data not shown) did not improve these results. The usefulness of PPA in the cycle which drives the reaction catalyzed by AGX1 in the forward direction was verified by an incubation without PPA (Table 1), which yielded lower GalNAc transfer (2.2 mol per mol peptide). Under the optimal conditions determined for the UDP-GalNAc regenerating glycosylation cycle, different peptides and a small protein were glycosylated and the glycosylation efficiencies compared to the stan-

standard glycosylation reaction by MALDI-TOF mass spectrometry (Table 1). Although the standard glycosylation employs a large excess of UDP-GalNAc and long incubation times, the regeneration cycle performed at least as well with much less substrate and shorter incubations.

The glycosylation efficiency of three ppGalNAcTs (ppGalNAcT1, T2, and T13) in the cycle was compared using the 40 aa peptide (MUC1)₂ as acceptor substrate (Table 2). Again,

Table 2. Glycosylation of (MUC1)₂ in the UDP-GalNAc regeneration cycle by using different ppGalNAc transferases.

Polypeptide αGalNAc transferases				
T1	T2	T13	T1 + T2	T1 + T13
Incorporation of GalNAc [mol per mol peptide]				
3.5	3.9	3.4	3.9	3.8
Ratio of peptides with 3 and 4 GalNAc residues per peptide [%]				
47:53	13:87	55:45	7:93	21:79

the glycosylated products were analyzed by MALDI-TOF mass spectrometry.^[30] The enzymatic cycle is very efficient with all three ppGalNAcTs yielding 100% of glycosylated peptide present as triglycosylated and tetraglycosylated forms with respective *m/z* values of 4366.9 and 4569.8 (Figure 1) in various proportions depending on the glycosyltransferase used. For ppGalNAcT1 and ppGalNAcT13 the two glycoconjugates were present in similar amounts (47:53 and 55:45 respectively) but with ppGalNAcT2, mass spectra clearly showed the tetraglycosylated peptide as the major product (ratio tri/tetra = 13:87). To characterize more precisely the glycopeptides, proteolysis was performed on the glycoconjugates. Protease Arg-C cleaved all the glycopeptides synthesized by the enzymes into three fragments carrying 1, 2, and 3 GalNAc residues. The results shown in Figure 2 are only for the ppGalNAcT2 transferase product, but the same was seen for the products of the two other transferase reactions. PpGalNAcT2 products were further digested by Asp-N and the results revealed Thr7, 19, and 27 as well as Ser18 as the most likely attachment points for the GalNAc residues. This is in agreement with published data showing a clear preference of Thr over Ser for all three ppGalNAc transferases used here^[31–32] as well as the higher ability of ppGalNAcT2 to glycosylate Ser adjacent to an already glycosylated Thr.^[33] The combination of two enzymes in the glycosylation cycle did not significantly change the amount of GalNAc incorporated suggesting that all three enzymes employed in this study glycosylate the same positions on the (MUC1)₂ peptide with T2 glycosylating Ser18 most efficiently. For all three enzymes the C-terminal sequence GSTA is not glycosylated probably because of the proximity of the carboxyl group.

Table 1. Comparison of UDP-GalNAc regeneration cycle and other glycosylation conditions with ppGalNAc T1 and different acceptor peptides.

Enzymatic method	Nucleotides	Incorporation of GalNAc [mol per mol peptide]			
		(STP) ₅ 17 aa	MUC1 20 aa	(MUC1) ₂ 40 aa	(MUC1) ₈ 172 aa
standard conditions ^[a]	UDP-GalNAc 3.6 mM	3.9	0.9	3.2	19.2
w/o CK ^[b]	UTP 4.0 mM	1.2	n.d. ^[e]	n.d. ^[e]	n.d. ^[e]
cycle w/o PPA ^[c]	UTP 0.2 mM	2.2	n.d. ^[e]	n.d. ^[e]	n.d. ^[e]
optimized cycle ^[d]	UTP 0.2 mM	3.2	1.0	3.4	21.3

[a] No cycle: ppGalNAcT1, CIP, and commercial UDP-GalNAc for 36 h. [b] No cycle: GK2, AGX1, ppGalNAcT1, PPA, and GalNAc for 15 h. [c] Cycle: GK2, AGX1, ppGalNAcT1, CK, and GalNAc for 15 h. [d] Optimized cycle: GK2, AGX1, ppGalNAcT1, CK, PPA, creatine-P, and GalNAc for 15 h (see the Supporting Information). GalNAc incorporation was determined by mass spectrometry. [e] n.d. = not determined.

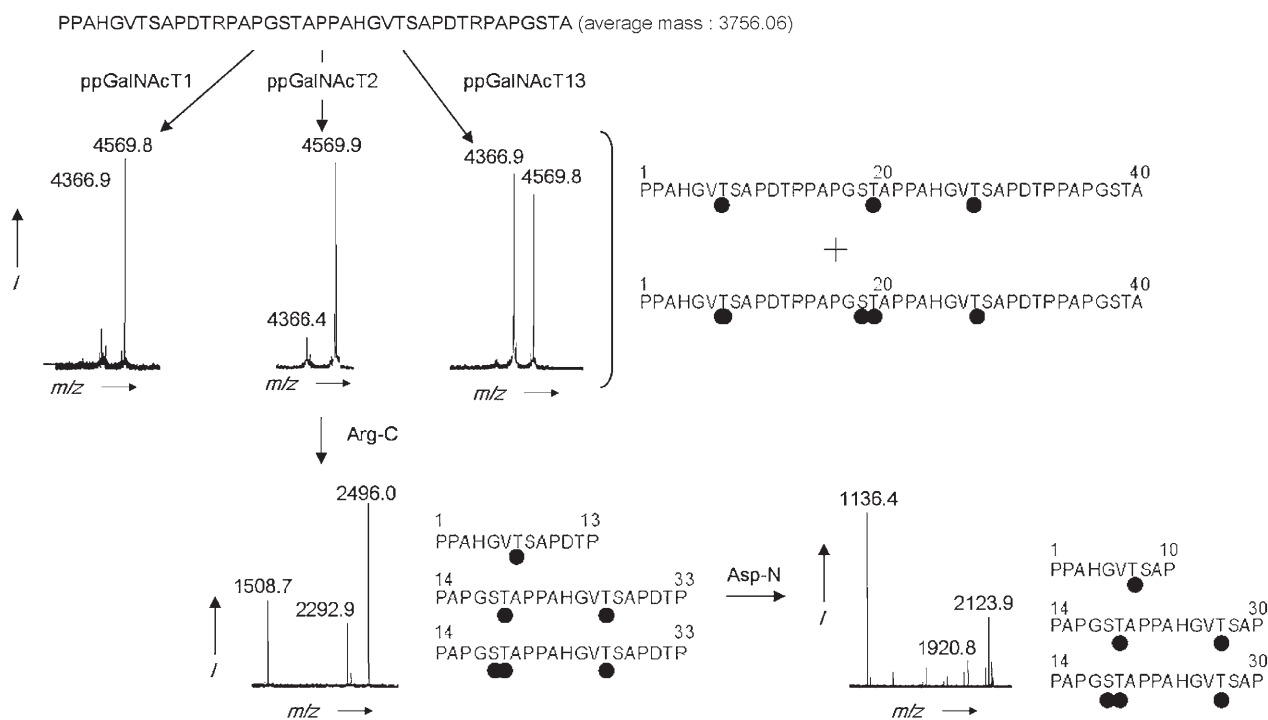


Figure 1. Glycosylation of $(MUC1)_2$ peptide by ppGalNAcT1 or T2 or T13 in the enzymatic cycle and determination of O-glycosylation sites by mass spectrometry analysis (MALDI-TOF). Closed circles mark the positions of glycosylation in the peptides.

The results obtained with ppGalNAcT1 for $(MUC1)_2$ could be extrapolated to a small protein of 172 aa composed of 8 MUC1 tandem repeats and a 6His tag, $(MUC1)_8$.^[34] The UDP-GalNAc regenerating cycle allowed the glycosylation of more than 20

positions with the ppGalNAcT1, as reported in Table 1 [d] and in Figure 2. As for $(MUC1)_2$, every Thr except the one in the PDTRP motif are glycosylated (16 positions) in the protein as well as half of the Ser in GSTA (four positions).

The bioreactor functions well with other glycosyltransferases utilizing UDP-GalNAc as sugar donor. The only condition for a transferase to be compatible with the regeneration cycle is to have K_m constants for UDP-GalNAc in the micromolar scale. As illustrated in Figure 3 the cycle developed here allows complete transformation of the blood group H-trisaccharide into the blood group A-tetrasaccharide using the human blood group A GalNAc transferase (GTA) as a purified recombinant enzyme produced in yeast (Supporting Information). On the

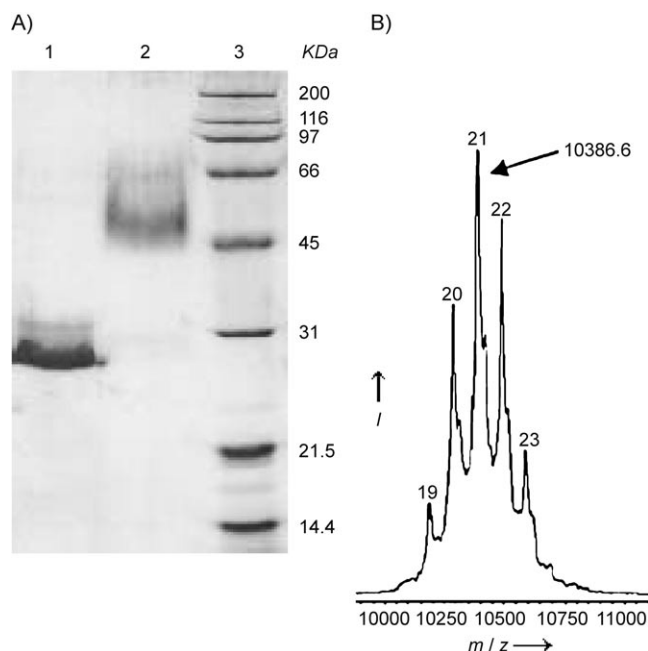


Figure 2. A) Coomassie-stained gel after SDS-PAGE of $(MUC1)_8$ (lane 1) and glycosylated $(MUC1)_8$ (lane 2); lane 3: molecular weight markers. B) Mass spectrum of glycosylated $(MUC1)_8$ with a representation of the $[M+2H]^{2+}$ ions.

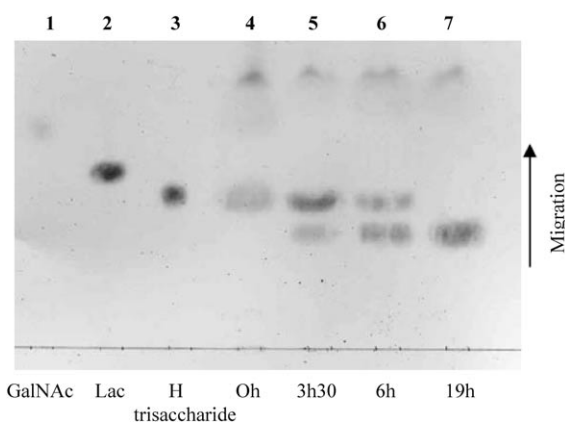


Figure 3. TLC plate analysis of the tetrasaccharide formation with enzymatic cycle at different incubation times (lanes 4 to 7). Standards: GalNAc, lactose (Lac), and H trisaccharide in lanes 1, 2, and 3 respectively.

other hand, glycosyltransferases with K_m constants in the millimolar range like LgtA, a N-acetyl glucosaminyl/galactosaminyl transferase from *Neisseria meningitidis*, give only very low yields (not shown).

In conclusion, the method developed here uses inexpensive substrates and low amounts of easily obtainable specific enzymes for the extensive glycosylation of peptides, proteins, and oligosaccharides. The cycle can be easily scaled up and several mg of highly glycosylated (MUC1)₈ have been obtained which may be utilized for immunological studies in mice. The UDP-GalNAc regeneration cycle can probably be used by all GalNAc transferases with K_m constants below 500 μM including EXTL2 and GM2 synthase. In addition, analogues of GalNAc can be tested in the cycle for transformation into UDP-sugar and for their potential as donor substrates for various GalNAc transferases.

Acknowledgements

We wish to thank A. Delmas, I. Decostaire, and P. Marceau (CBM, Orléans) for the generous gift of peptides, C. Buré and R. Puppò (CBM, Orléans) for training and expert help with mass spectrometry, and N. Bureaud for skilled technical assistance. This work was supported by grants from the Ligue Nationale contre le Cancer (comités départementaux du Loiret et du Loir et Cher) and by the Groupement de Recherche: Génomique et Génie des Glycosyltransférases. M.C. wishes to thank the CNRS for granting ATIP financing. The award of a fellowship to V.B. by the Région Centre and the CNRS is gratefully acknowledged.

Keywords: chemoenzymatic synthesis • glycosylation • glycosyltransferases • mucin • sugar-nucleotide

- [1] A. Varki, R. Cummings, J. Esko, H. Freeze, G. Hart, J. Marth, *Essentials of Glycobiology*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, **1999**.
- [2] A. Helenius, M. Aebi, *Annu. Rev. Biochem.* **2004**, *73*, 1019–1049.
- [3] R. S. Haltiwanger, J. B. Lowe, *Annu. Rev. Biochem.* **2004**, *73*, 491–537.
- [4] P. M. Rudd, M. R. Wormald, R. A. Dwek, *Trends Biotechnol.* **2004**, *22*, 524–530.
- [5] L. V. Hooper, J. I. Gordon, *Glycobiology* **2001**, *11*, 1R–10R.
- [6] C. R. Bertozzi, L. L. Kiessling, *Science* **2001**, *291*, 2357–2364.
- [7] S. Blanchard, J. S. Thorson, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 263–271.
- [8] Z. Guo, N. Shao, *Med. Res. Rev.* **2005**, *25*, 655–678.
- [9] K. M. Koeller, C. H. Wong, *Nature* **2001**, *409*, 232–240.
- [10] A. Holemann, P. H. Seeberger, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2004**, *15*, 615–622.
- [11] A. M. Daines, B. A. Maltman, S. L. Flitsch, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 106–113.
- [12] M. R. Pratt, C. R. Bertozzi, *Chem. Prod.* **2005**, *34*, 58–68.
- [13] C. Brocke, H. Kunz, *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 3085–3112.
- [14] C. H. Wong, S. L. Haynie, G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 5416–5418.
- [15] C. Auge, C. Mathieu, C. Merienne, *Carbohydr. Res.* **1986**, *151*, 147–156.
- [16] Y. Ichikawa, Y. C. Lin, D. P. Dumas, G. J. Shen, E. Garciajunceda, M. A. Williams, R. Bayer, C. Ketcham, L. E. Walker, J. C. Paulson, C. H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9283–9298.
- [17] C. H. Hokke, A. Zervosen, L. Elling, D. H. Joziassie, D. H. van den Eijnden, *Glycoconjugate J.* **1996**, *13*, 687–692.
- [18] A. Zervosen, L. Elling, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 1836–1840.
- [19] X. Chen, J. Fang, J. Zhang, Z. Liu, J. Shao, P. Kowal, P. Andreana, P. G. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 2081–2082.
- [20] S. L. Haynie, G. M. Whitesides, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1990**, *23*, 155–170.
- [21] Y. Ichikawa, J. L. C. Liu, G. J. Shen, C. H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 6300–6302.
- [22] J. Shao, J. Zhang, P. Kowal, P. G. Wang, *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68*, 5634–5640.
- [23] J. Shao, T. Hayashi, P. G. Wang, *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, *69*, 5238–5242.
- [24] T. Endo, S. Koizumi, K. Tabata, S. Kakita, A. Ozaki, *Carbohydr. Res.* **2001**, *330*, 439–443.
- [25] S. G. Lee, J. O. Lee, J. K. Yi, B. G. Kim, *Biotechnol. Bioeng.* **2002**, *80*, 516–524.
- [26] I. Pastuszak, R. Drake, A. D. Elbein, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 20776–20782.
- [27] A. Wang-Gillam, I. Pastuszak, A. D. Elbein, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 27055–27057.
- [28] V. Bourgeaux, F. Piller, V. Piller, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 5459–5462.
- [29] T. Freire, R. Lo-Man, F. Piller, V. Piller, C. Leclerc, S. Bay, *Glycobiology* **2006**, *16*, 390–401.
- [30] M. Cadene, B. T. Chait, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 5655–5658.
- [31] Y. Zhang, H. Iwasaki, H. Wang, T. Kudo, T. B. Kalka, T. Hennem, T. Kubota, L. Cheng, N. Inaba, M. Gotoh, A. Togayachi, J. Guo, H. Hisatomi, K. Nakajima, S. Nishihara, M. Nakamura, J. D. Marth, H. Narimatsu, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 573–584.
- [32] H. H. Wandall, H. Hassan, E. Mirgorodskaya, A. K. Kristensen, P. Roepstorff, E. P. Bennett, P. A. Nielsen, M. A. Hollingsworth, J. Burchell, J. Taylor-Papadimitriou, H. Clausen, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 23503–23514.
- [33] F. G. Hanisch, C. A. Reis, H. Clausen, H. Paulsen, *Glycobiology* **2001**, *11*, 731–740.
- [34] G. A. Cremer, N. Bureaud, V. Piller, H. Kunz, F. Piller, A. F. Delmas, *Chem-MedChem* **2006**, *1*, 965–968.

Received: September 6, 2006

Published online on November 17, 2006

II.1.2. Essais d'optimisation du cycle enzymatique

Nous venons de voir que le cycle enzymatique fonctionne efficacement pour la glycosylation des peptides et des oligosaccharides et permet d'obtenir avec de bons rendements les produits avec un nombre maximal de positions occupées. Néanmoins, plusieurs analyses menées sur différents peptides ((STP)₅AG et (MUC1)₈), ont montré qu'il y avait une concentration optimale en peptide à introduire dans le mélange réactionnel. Au delà de cette concentration, le nombre de GalNAc incorporés par peptide diminue et cette diminution est inversement proportionnelle à la quantité de peptide accepteur engagée dans la réaction. Afin de déterminer si le GalNAc est le réactif limitant, nous avons mené en parallèle trois expériences en introduisant différentes quantités de GalNAc dans la réaction et avons estimé la quantité de chacune des espèces porteuses de GalNAc après séparation par chromatographie échangeuse d'anions (tableau X). L'essai 1 correspond aux conditions standards avec 3,9 mM de GalNAc. Alors que les essais 1 et 2 permettent l'incorporation de 5 GalNAc/peptide, l'essai 3 dans lequel on a introduit la plus grande quantité de GalNAc ne conduit qu'à 3,5 GalNAc/peptide. Ce résultat est surprenant d'autant plus que l'on se serait attendu à une incorporation similaire voire meilleure que pour les deux autres essais. L'analyse des espèces présentes à l'équilibre montre que dans les trois cas de figure, le GalNAc résiduel est environ de 20%. Ce résultat prouve que l'enzyme GK2 catalyse le transfert de phosphate avec le même rendement, indépendamment de la quantité de GalNAc introduite et n'est donc pas la cause de cette baisse d'incorporation.

Essai	t = 0 h	t = 16 h			
	GalNAc	GalNAc	GalNAc-1-P	UDP-GalNAc	GalNAc Incorporé
1	3,9 mM	22 %	24 %	4 %	50 %
2	5,2 mM	15 %	40 %	4 %	41 %
3	6,5 mM	21 %	53 %	4 %	22 %

Tableau X. Bilan en espèces pour des mélanges réactionnels de glycosylation du peptide (STP)₅AG (0,4 mM) incubés la nuit à 37°C en présence de différentes quantités de GalNAc. La quantité des produits présents en fin de réaction a été estimée par comptage radioactif des fractions obtenues après séparation sur colonne échangeuses d'anions.

En revanche, à la fin de l'incubation, il y a une accumulation de GalNAc-1-P dans le milieu. Cette accumulation est d'autant plus grande que la quantité de GalNAc est importante (24 % pour l'essai 1 et 53 % pour l'essai 3). Tout porte à croire que le cycle s'arrête après un certain nombre de tours et qu'un des partenaires impliqué dans la conversion du GalNAc-1-P en UDP-GalNAc n'est plus actif. Les essais d'addition individuelle d'enzymes fraîches ou

d'UTP au bout de 7h30 d'incubation ont été vains et n'ont pas permis le redémarrage du cycle (quantité similaire de GalNAc incorporée au peptide). Afin de déterminer la raison de la glycosylation limitée pour les grandes quantités de peptide, nous avons réalisé une chromatographie sur papier (figure 35). Cette analyse permet d'évaluer les quantités des espèces contenant de l'uridine radiomarquée à la fin de l'incubation.

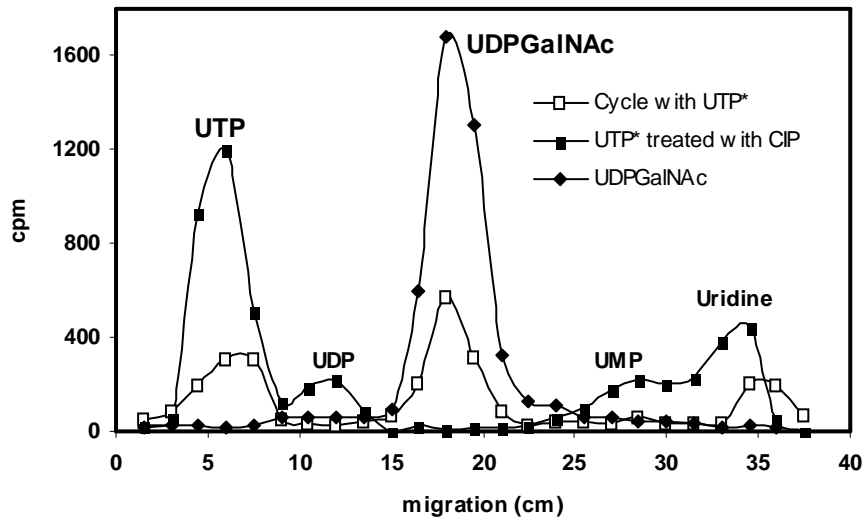


Figure 35. Analyse par chromatographie sur papier d'un mélange enzymatique pour la glycosylation de STP5AG incubé pendant la nuit en présence d'UTP radiomarqué.

Les courbes témoins (carrés ouverts et fermés) permettent d'identifier les produits présents dans le mélange réactionnel (losanges), à savoir de l'UTP, de l'UDP-GalNAc et de l'uridine. L'accumulation de GalNAc-1-P et l'apparition d'uridine pourraient provenir de la dégradation de l'UDP-GalNAc en présence de $MnCl_2$ en UMP et GalNAc1-P. La quantité catalytique d'UDP nécessaire au bon fonctionnement du cycle est progressivement dégradée en UMP puis en uridine ce qui doit avoir pour conséquence d'inhiber une voire plusieurs enzymes et de stopper la biosynthèse du glycopeptide.

Ceci limite la capacité du cycle à glycosyler des grosses quantités de peptides. Un moyen de pallier ce problème serait d'ajouter une nucléoside kinase spécifique capable de phosphoryler le produit de dégradation UMP en UDP. D'un autre côté, ceci augmenterait le prix de la synthèse inutilement puisque l'on peut glycosyler de plus larges quantités en incubant des volumes réactionnels plus conséquents. Pour donner une idée chiffrée, pour obtenir 20 mg de produit glycosylé, il faudrait incuber un mélange réactionnel de 50 mL, ce qui est tout à fait envisageable.

L'utilisation du système multi-enzymatique pour la synthèse de glycoconjugués est une méthode de choix et la glycosylation à grande échelle des peptides (STP)₅AG et (MUC1)₈, dont les rendements respectifs après purification sont de 59 % et 34 %, en témoigne. Contrairement à la synthèse chimique qui conduit fréquemment à un mélange d'anomères indésirables et utilise des conditions souvent trop drastiques pour le saccharide, l'emploi d'enzymes stéréospécifiques permet d'obtenir de manière très propre le produit dans la configuration souhaitée sans difficulté majeure de purification. Malgré les améliorations constantes de la synthèse par voie chimique qu'il s'agisse de la réduction du nombre d'étapes, de l'utilisation de catalyseurs et réactifs plus efficaces ou encore de l'automatisation des procédés, la polyfonctionnalité des molécules saccharidiques oblige une mise au point au cas par cas. L'emploi d'une enzyme spécifique ne permet pas non plus de synthétiser un panel large de molécules. Cependant, la simplicité des techniques de clonage et d'expression permet de disposer rapidement des enzymes adaptées à la synthèse que l'on souhaite réaliser à la condition toutefois que ces enzymes se produisent aisément sous forme recombinante.

II.2. Synthèse de glycopeptides et évaluation immunologique

Nous avons vu dans la partie introductive que le peptide MUC composé de 20 aminoacides constitue une cible anti-tumorale de certains cancers et les publications portant sur l'élaboration d'un vaccin anti-cancéreux à base de MUC se multiplient. Certains travaux ont également montré que les peptides glycosylés étaient de meilleurs immunogènes que les peptides nus. Dans ce contexte, nous avons utilisé le cycle enzymatique pour la glycosylation de 3 peptides d'intérêt thérapeutique à savoir (MUC1)₈, (MUC1)₈ PADRE biologique, (MUC1)₈ PADRE chimique, ceci afin de tester le pouvoir immunogène *in vivo* des produits glycosylés ou non et de déterminer la construction la plus adaptée à un procédé de vaccination.

La taille de l'antigène peptique est un facteur déterminant pour la réponse immunologique. Bien que le motif APDTR soit l'épitope immunodominant de la séquence MUC1, les études suggèrent que l'immunogénicité liée à cette épitope pourrait dépendre de la structure qu'il adopte et que des oligomères de MUC1 favorisent une conformation proche de la structure native de la mucine non-glycosylée et sont de biens meilleurs immunogènes que le monomère. Pour ces raisons, nous avons choisi l'oligomère (MUC1)₈, dont les 8 unités

devraient permettre au déterminants antigéniques d'adopter la structure la plus favorable. D'autre part, le PADRE (Pan DR Epitope) est un épitope T universel parfois ajouté aux constructions pour augmenter la réponse humorale (Alexander *et al.*, 1994, del Guercio *et al.*, 1997). Ce 10-mer, lié covalamment à l'épitope antigénique en C-ter, contient des aminoacides non naturels hydrophobes (comme la cyclohexylalanine et la D-alanine), est reconnu par les molécules du CMH de classe II et est capable de recruter les cellules T et donc d'accroître la réponse. Néanmoins, la synthèse chimique de cet épitope est difficile à réaliser (Cremer *et al.*, 2006b). Dans notre cas, l'épitope antigénique (MUC1)₈ est produit en tant que protéine recombinante chez *E. coli*. Il faut donc réaliser une étape de ligation chimique dite « native » entre (MUC)₈ et le PADRE obtenu par synthèse chimique, dit PADRE chimique pour obtenir le produit appelé : (MUC1)₈ PADRE chimique. Dans le souci de réduire le nombre d'étapes et de faciliter la production des molécules immunogènes porteuses de PADRE, nous avons également réalisé une construction équivalente chez *E.coli* à savoir la protéine (MUC1)₈ taggée avec un PADRE que l'on nommera biologique puisqu'il ne contient que des aminoacides naturels. Dans ce PADRE biologique, la cyclohexylalanine est remplacée par une phénylalanine dont l'hydrophobicité est comparable et la D-alanine est remplacée par une L-alanine. Si la réponse humorale induite par cet immunogène est identique à celle observée pour le (MUC1)₈ PADRE chimique, cela facilitera grandement la production future des immunogènes porteurs de PADRE.

II.2.1. Glycosylation enzymatique des peptides

Les peptides (MUC1)₈ et (MUC1)₈ PADRE biologique ont été produits en tant que protéines recombinantes chez *E.coli* par Nicole Bureau dans notre équipe à raison de 10 mg/L de culture et 5 mg/L de culture respectivement. Le (MUC1)₈ PADRE chimique est obtenu de manière quantitative par ligation entre le peptide (MUC1)₈ préalablement activé sous forme de thioester et le PADRE synthétisé dans le groupe d'Agnès Delmas et possédant un résidu Cys en N-ter.

Les 3 peptides ont été glycosylés en utilisant le cycle enzymatique et ont été préparés à l'échelle du mg ceci afin de disposer de suffisamment de matériel pour l'évaluation immunologique. Les mélanges réactionnels de 2,5 ml contenant les peptides accepteurs ainsi que les substrats, enzymes et cofacteurs nécessaires à la glycosylation ont été incubés pendant 16 h à 37°C. A la fin de l'incubation, les enzymes sont précipitées au MeOH. L'étiquette 6His des produits glycosylés permet leur purification en une seule étape de chromatographie par affinité sur support Ni-NTA. Cette étape permet d'éliminer complètement la SAB, ce que l'on

ne parvient pas à faire si on passe le mélange sur DOWEX ou sur Sep-Pak. Le gel SDS-PAGE de la figure 36 montre les différentes étapes, de la glycosylation enzymatique à la purification du produit glycosylé, pour le (MUC1)₈ PADRE chimique. Les résultats indiquent que la totalité du peptide est glycosylé et que ce produit de glycosylation est retenu de manière spécifique sur la colonne de Ni-NTA.

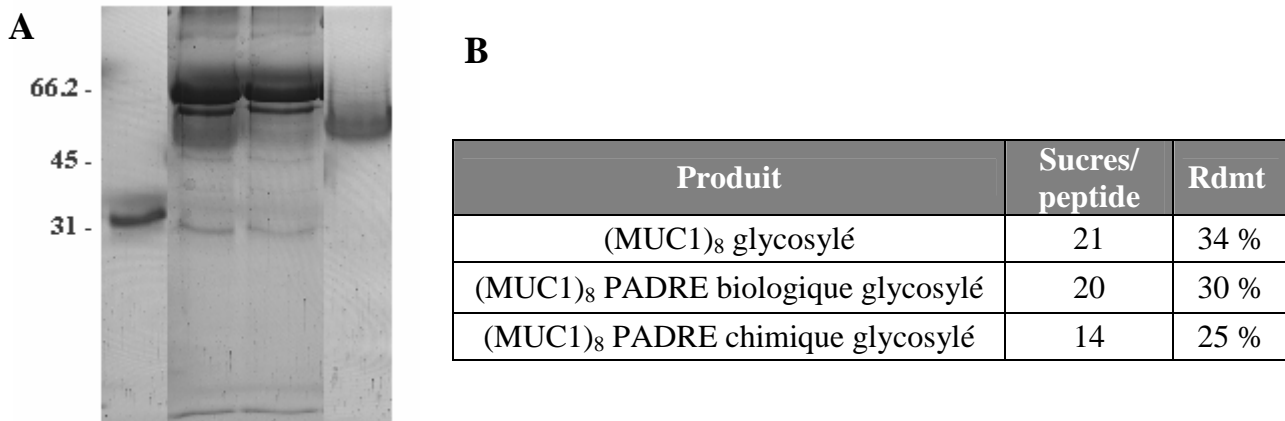


Figure 36. A. Gel SDS-PAGE à 12% en conditions dénaturantes montrant la purification des protéines glycosylées sur Ni-NTA. Puits 1, (MUC1)₈ PADRE; Puits 2, mélange réactionnel de glycosylation du (MUC1)₈ PADRE; Puits 3, protéines non fixées à la colonne de Ni-NTA; Puits 4, élution de colonne. **B.** Tableau indiquant les rendements globaux de synthèse après purification des produits glycosylés.

Les rendements globaux après purification sont de 30 % en moyenne (figure 36, B).

La perte de matériel peut s'expliquer par une précipitation dans le mélange réactionnel observée à la fin de l'incubation, et ceci malgré toutes les précautions prises (présence de glycérol, ajout séquentiel des composés). Une analyse par SDS-PAGE de ce précipité a montré qu'il contenait principalement de la SAB, mais que toutes les protéines, y compris le produit de glycosylation, étaient également partiellement précipitées. Cette précipitation pourrait éventuellement s'expliquer par la présence d'agents réducteurs résiduels de la préparation des peptides MUC. Il faut noter aussi que la glycosylation du (MUC1)₈ PADRE chimique a été moins efficace puisque le produit glycosylé possède en moyenne 14 sucres, comme l'atteste l'analyse par SM. L'imidazole utilisé pour éluer les produits du gel de Ni-NTA est éliminé lors d'une étape de dialyse contre du PBS et les produits, qu'ils soient glycosylés ou non, sont prêts à être injectés pour une étude immunologique *in vivo*.

II.2.2. Evaluation immunologique des composés d'intérêt thérapeutique

Le pouvoir immunogène des composés synthétisés à savoir (MUC1)₈, (MUC1)₈ PADRE biologique, (MUC1)₈ PADRE chimique et leurs formes glycosylées a été évalué dans le modèle murin. Les produits ont été injectés par Nicole Bureau par voie sous-cutanée à des souris C57B16 consanguines de sexe et d'âge identiques. Chacun des produits a été testé sur 5

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Après la première immunisation, les produits (3') et (5') sont les premiers à induire une production accrue d'anticorps IgM (Abs 405 nm = 0,65 et 0,85 respectivement) mais également IgG. La différence avec le produit (1') qui lui aussi est non glycosylé mais pour lequel la réponse est plus faible (Abs 405 nm = 0,25) est sans doute due à la présence de l'épitope PADRE dont la capacité à recruter les cellules T accélère la production d'anticorps. Après la quatrième immunisation, on observe une réponse satisfaisante pour la totalité des produits (Abs 405 nm > 0,5) excepté pour le produit 2' pour lequel il n'y a pas de production d'anticorps. Pour tous les autres produits, on voit comme attendu lors d'une réponse humorale une inversion dans les quantités d'IgM et d'IgG produites entre la première et la quatrième immunisation mais également une augmentation du taux d'anticorps.

Cette réponse est typique des antigènes thymo-dépendants pour lesquels l'interaction avec les lymphocytes B n'est pas suffisante pour déclencher la synthèse d'anticorps. Cette synthèse nécessite l'interaction du lymphocyte B avec un lymphocyte T helper, ce qui pourrait en outre expliquer la différence de production lors de la première immunisation entre le produit 1' et les produits 3' et 5' qui bénéficient d'un épitope T universel. De manière générale, tous les produits sauf le (MUC1)₈ glycosylé (2') semblent immunogènes ; la différence entre les produits apparaissant surtout au niveau du temps de latence avant la réponse primaire.

Afin de comparer la réponse humorale en fonction de la présence ou non d'un épitope PADRE sur l'immunogène et d'évaluer la spécificité de reconnaissance des anticorps produits, des titrations en anticorps ont été réalisées après la 4^{ème} immunisation. Deux antigènes ont été immobilisés sur la plaque de microtitration : (MUC1)₈ et (MUC1)₈ glycosylé. Les quatre graphes de la figure 39 représentent la quantité d'immunoglobulines IgG contenus dans les sera pour tous les composés. Les graphes A1 et A2 représentent les produits non glycosylés et les graphes B1 et B2, les produits glycosylés.

Le premier constat qui peut être fait est que quelque soit le produit injecté, au sein de chaque lot de souris, les réponses sont homogènes. Les graphes A1 et B1 représentent pour l'ensemble des produits les courbes de titration avec (MUC1)₈ comme antigène immobilisé. Les résultats pour les produits non glycosylés (A1) montrent une réponse identique qu'il y ait ou non la présence du PADRE. Ceci indique que le peptide (MUC1)₈ est très immunogène et que pour obtenir une réponse humorale, il n'est pas nécessaire de lui adjoindre un épitope PADRE. En revanche, on observe une nette différence dans la réponse induite par les produits glycosylés (B1). Le (MUC1)₈ glycosylé n'induit aucune réponse, alors que les constructions

avec le PADRE induisent la production d'anticorps, la plus forte réponse étant obtenue avec le PADRE chimique. Ces résultats préliminaires semblent indiquer que la glycosylation de type GalNAc n'améliore pas l'immunogénicité des composés et inhibe même la réponse induite par l'épitope peptidique.

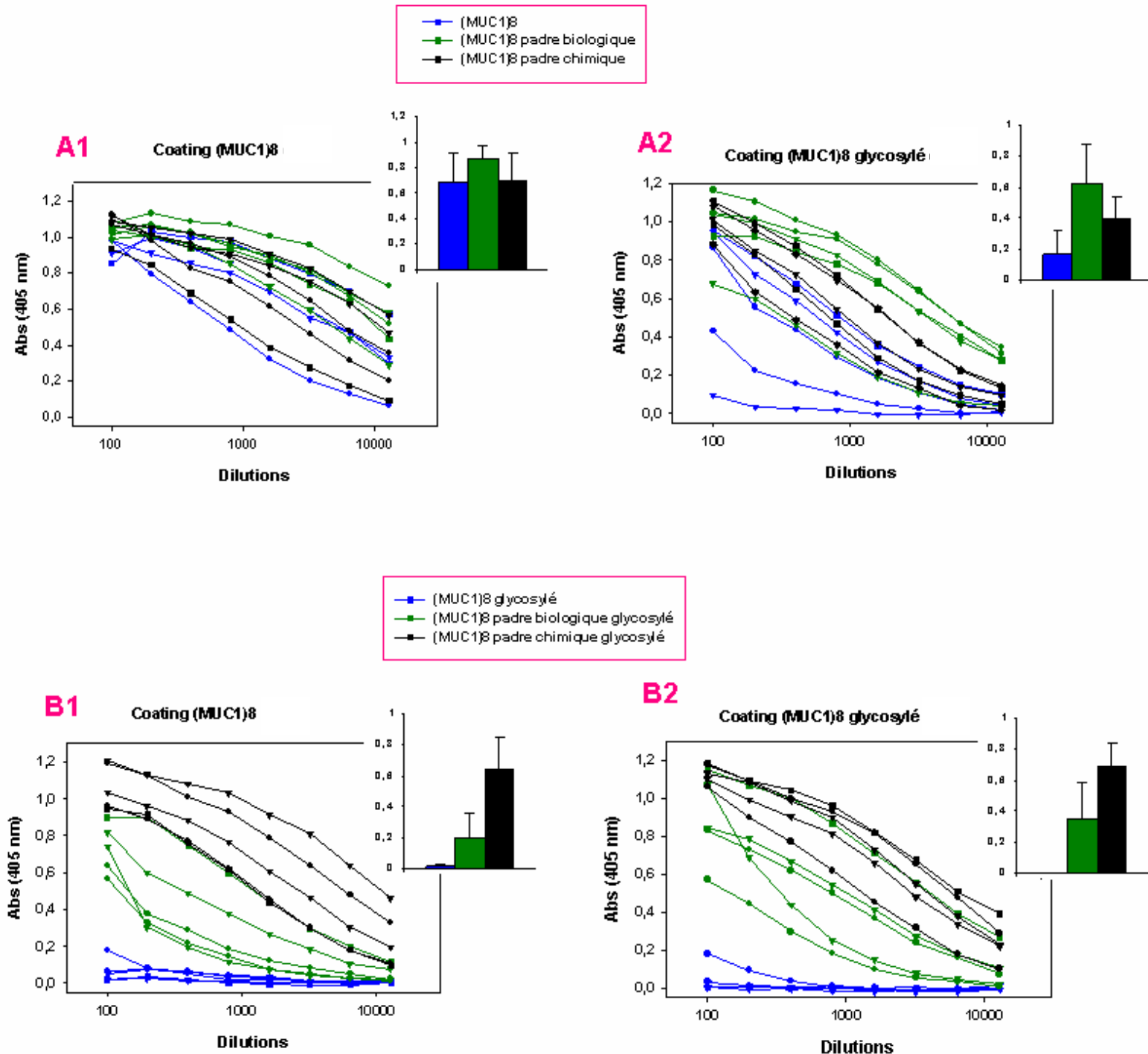


Figure 39 . Titration en anticorps par tests ELISA sur les sera prélevés 15 jours après la 4^{ème} immunisation. Les souris ont été immunisées à 4 reprises à trois semaines d'intervalle avec 25 µg de peptide et l'adjuvant alum. Les anticorps anti-(MUC1)₈ et anti-(MUC1)₈ glycosylé ont été révélés avec un anticorps secondaire de chèvre anti-IgG de souris couplé à la peroxydase. Une lecture à 405 nm permet d'évaluer la quantité d'anticorps. Pour chacun des produits, les 5 souris sont représentées par 5 courbes de couleur identique. Les histogrammes représentent la moyenne des 5 souris pour chaque produit à la dilution en sérum (1/1600).

Très peu de travaux dans la littérature comparent l'immunogénicité entre des antigènes glycosylés et leur forme non glycosylée et les études allant dans le sens d'une immunogénicité de l'épitope saccharidique concernent le monomère de MUC1 avec un GalNAc sur le motif APDTR immunodominant (Karsten *et al.*, 1998, Karsten *et al.*, 2004). Dans ce cas précis, la présence du sucre permettrait à l'antigène d'adopter une conformation rigide et étendue plus favorable à l'obtention d'une réponse immunitaire par rapport au peptide nu. Dans notre travail, le peptide étudié est suffisamment long pour adopter la structure requise et il semble que la présence de sucres masque le déterminant antigénique. Il est vrai que la thréonine du motif PDTR de nos produits n'est pas glycosylée, les ppGalNAc T1, T2 et T13 n'étant pas capables de catalyser ce transfert de GalNAc sur une Thr encadrée par des acides aminés chargés.

Nous voulions tester si les deux PADRE, chimique ou biologique, dont la séquence est très voisine, pouvaient induire une réponse identique et nous avons constaté que ce n'est pas le cas pour les produits glycosylés. D'autre part, l'absence de réponse pour le (MUC1)₈ glycosylé suggère une immunogénicité très réduite du produit glycosylé. Un épitope antigénique Tn isolé et non situé dans un cluster d'au moins 3 GalNAc-Ser/Thr, n'est pas suffisamment immunogène pour générer une réponse contre les glycanes (Vichier-Guerre *et al.*, 2000) et les sucres présents (21 unités sur le (MUC1)₈) semblent même inhiber la réponse contre les épitopes peptidiques très immunogènes. Lorsque l'on ajoute le PADRE à cette structure glycosylée peu immunogène, elle reprend son rôle d'activateur des cellules T helper (Alexander *et al.*, 1994) et il y a restauration de la réponse humorale. Les différences observées dans la réponse immunitaire entre les antigènes couplés au PADRE biologique et au PADRE chimique peuvent s'expliquer par la différence de glycosylation obtenue sur les deux produits. En effet, le composé **4'** (avec le PADRE biologique) contient 20 sucres alors que le composé **6'** (avec le PADRE chimique) n'en contient que 14. Pour ce dernier composé, l'épitope peptidique étant plus accessible, il peut contribuer à l'immunogénicité de l'antigène ce qui n'est pas le cas pour le composé **4'** pour lequel la chaîne peptidique est d'avantage masquée.

Les graphes A2 et B2 pour lesquels du (MUC1)₈ glycosylé a été immobilisé permettent par comparaison aux graphes A1 et B1 de déterminer la spécificité de reconnaissance des anticorps produits. La comparaison des graphes A1 et A2 pour les produits non glycosylés montre une meilleure reconnaissance des anticorps produits pour le (MUC1)₈ non glycosylé, ce à quoi l'on pouvait s'attendre. Pour les anticorps générés par les

produits glycosylés (4') et (6'), les résultats confirment l'hypothèse d'une réponse immunitaire réduite. Pour le (MUC1)₈ PADRE biologique glycosylé (en vert), les anticorps reconnaissent un peu mieux l'épitope glycosylé (graphes B1 et B2) ce qui est en accord avec le fait que la partie peptidique est partiellement recouverte et que la présence de PADRE augmente la production d'anticorps spécifiques de la structure glycosylée. Pour le (MUC1)₈ PADRE chimique, on a vu qu'il y avait moins de sucres et une plus grande contribution de l'épitope peptidique pourrait expliquer pourquoi les anticorps produits reconnaissent aussi bien l'antigène glycosylé que le non glycosylé.

Pour conclure, ces expériences *in vivo* montrent que le polypeptide (MUC1)₈ est un bon immunogène dans le modèle murin. Les anticorps sont produits en grande quantité et reconnaissent spécifiquement l'antigène (MUC1)₈. Contrairement à ce que l'on pourrait attendre, la glycosylation des Thr à l'extérieur de l'épitope immunodominant n'améliore pas le pouvoir immunogène du composé. Bien au contraire, en l'absence d'un épitope T puissant, une glycosylation importante du peptide (20 sucres) abolit la réponse immunitaire. Ces résultats sont en accord avec une publication récente qui montre que la glycosylation Tn n'est pas avantageuse pour l'immunité cellulaire (Stepensky *et al.*, 2006). Nos expériences semblent indiquer que c'est également vrai pour une réponse humorale. Les peptides glycosylés avec des épitopes Tn isolés ne sont pas suffisamment immunogènes pour être une cible immunologique. Des chaînes glycaniques plus longues, disaccharidiques (épitope T, STn) ou encore trisaccharidiques (ST), pourraient être de meilleures cibles, c'est d'ailleurs ce qui a été montré dans une étude récente avec l'épitope T sur le motif PDTR (Cremer *et al.*, 2006a). Cependant, là encore la position glycosylée n'est pas la même que pour les produits de l'étude présentée ici et il serait intéressant de tester l'immunogénicité d'un antigène glycosylé par voie enzymatique et par voie chimique sur ce motif PDTR.

Un autre résultat intéressant concerne l'épitope T universel PADRE. Nous avons vu que pour les produits non glycosylés, le PADRE jouait un rôle dans la rapidité de production des anticorps permettant ainsi d'avoir une réponse humorale correcte après la première immunisation sans pour autant apporter de réel bénéfice quant au taux d'anticorps produits après la quatrième immunisation. Ce résultat montre que la taille de (MUC1)₈ est suffisante pour stimuler les cellules B contrairement au monomère (MUC1) qui nécessite la présence d'une protéine porteuse complexe de type KLH. En revanche, pour les produits peu immunogènes comme les peptides glycosylés, le PADRE a prouvé son efficacité en augmentant considérablement la réponse immunitaire. Dans ce cas précis, lorsque le peptide

est saturé en sucres (20 unités), les anticorps sont plus spécifiques du (MUC1)₈ glycosylé. Il est également intéressant de noter que les épitopes PADRE biologique et chimique semblent répondre de manière similaire. La possibilité de substituer le PADRE biologique au PADRE chimique ne peut que faciliter par la suite la production des antigènes-PADRE qui pourront intégralement être synthétisés dans la bactérie et aisément purifiés en une seule étape grâce à une étiquette 6-His. Toutes ces affirmations devraient cependant être confirmées par des analyses complémentaires. Une cinquième injection est d'ailleurs en cours pour détecter une éventuelle réponse humorale du produit (MUC1)₈ glycosylé qui serait plus tardive.

II.3. Conclusion

Nous avons mis au point une méthode enzymatique efficace capable de réaliser le transfert de GalNAc sur des oligosaccharides et des peptides à partir de substrats donneurs simples (GalNAc, créatine-P et UTP en quantité catalytique). Ce système produit de l'UDP-GalNAc en intermédiaire car ce composé est immédiatement utilisé par les GalNAc transférases et l'UDP formé alors est aussitôt recyclé. Le système présente l'avantage d'éviter l'accumulation d'UDP, l'un des produits de la réaction de transfert et qui est un inhibiteur des glycosyltransférases. L'absence d'UDP dans le cycle permet donc de transférer des grandes quantités de GalNAc sans utiliser un large excès de nucléotide-sucres susceptible de ralentir considérablement la réaction enzymatique. Cette technique semble être applicable à une large panoplie de glycoconjugués, la seule limite étant le K_m pour l'UDP-GalNAc des glycosyltransférases employées, car dans ce cycle il ne peut y avoir que de très faibles quantités d'UDP-GalNAc disponibles pour les enzymes. Le système peut sûrement être encore amélioré car nous avons constaté que le cycle s'arrêtait après une dizaine de tours et qu'il y avait une accumulation d'UMP et de GalNAc-1-P. Une addition d'UMP kinase devrait prolonger la demi-vie du cycle en réduisant l'accumulation d'UMP.

Ce protocole de synthèse a été appliqué à la préparation de glycopeptides de type mucines et nous avons pu produire des quantités suffisantes de ces substances pour en faire une étude immunologique chez la souris. Pour cela, après purification des petites glycoprotéines synthétisées dans notre « bioréacteur », ces substances (pures à 90 %) ont pu être injectées aux souris. Dans notre étude comparative, nous avons examiné la réponse immunitaire obtenue contre des peptides et glycopeptides porteurs ou non d'un épitope T helper. En utilisant un adjuvant faible qui n'est pas lui-même immunogène, nous avons noté que la glycosylation diminuait la réponse immune et que cette réponse était en grande part

RÉSULTATS ET DISCUSSION

dirigée contre la partie peptidique des glycoprotéines. L'épitope T helper s'est avéré indispensable pour provoquer une réponse humorale contre (MUC1)₈ glycosylé. A l'heure actuelle, deux hypothèses peuvent être émises :

- l'antigène glycosylé n'est pas ou peu présenté par les cellules présentatrices
- il y a inhibition par l'antigène glycosylé de l'interaction entre les cellules du système immunitaire.

La présence de l'épitope T helper serait nécessaire soit pour compenser la faible quantité d'antigène glycosylé présenté, soit pour lever l'inhibition en stimulant le système immunitaire. Des expériences sont en cours pour tester ces deux hypothèses.

III. SYNTHÈSE ET EVALUATION DE SONDES DE LA PPGALNAC-T1

Nous avons discuté dans les généralités de l'intérêt de disposer de sondes de glycosyltransférases afin d'étudier d'une part le rôle fonctionnel des structures glycaniques générées par ces enzymes mais également de préciser le mécanisme de transfert des monosaccharides. Notamment, la *O*-glycosylation de type mucine fait partie des domaines de la glycosylation pour lesquels de nombreux points restent à éclaircir. Le mécanisme enzymatique et la reconnaissance des substrats par les enzymes polypeptide transférases qui initient ce processus sont mal connus. A ce jour, seules trois isoformes de cette classe d'enzymes ont été cristallisées : ppGalNAc-T1 (Fritz *et al.*, 2004), ppGalNAc-T2 (Fritz *et al.*, 2006), et ppGalNAc-T10 (Kubota *et al.*, 2006). L'hydrolyse rapide de l'UDP-GalNAc complique l'obtention de l'enzyme cristallisée en présence de son substrat donneur et dans la majorité des cas, les cristaux recueillis sont des cristaux de l'enzyme en complexe avec son cofacteur et/ou de l'UDP donc très peu informatifs sur le mécanisme de coupure de l'UDP-GalNAc. Les cristaux de ppGalNAc-T10 sont les seuls à contenir à la fois de l'UDP et du GalNAc, et constituent une source d'information nouvelle concernant le site de fixation du motif GalNAc. Ces résultats concernant la partie saccharidique de l'UDP-GalNAc pourraient être transposables à l'enzyme qui nous intéresse, à savoir la ppGalNAcT1, sous réserve que la différence de spécificité de substrat accepteur entre les deux isoformes n'influence pas la fixation du substrat donneur. Il est vrai que les deux enzymes possèdent des séquences peptidiques relativement éloignées mais les aminoacides interagissant avec l'UDP et le GalNAc dans la ppGalNAc-T10 sont presque intégralement (sauf 1 sur 15) conservés dans la T1. Néanmoins, la synthèse d'une molécule inhibitrice ou encore d'un substrat donneur non hydrolysable des ppGalNAc-Ts serait beaucoup plus appropriée pour l'étude de la relation structure-activité et la cristallisation de ces enzymes. Dans ce chapitre, nous décrivons la synthèse de divers analogues de l'UDP-GalNAc dont l'évaluation comme substrat donneur ou inhibiteur de la ppGalNAc-T1 a permis de déterminer le ou les candidats les plus adaptés pour l'étude de l'interaction substrat-ligand par STD-NMR.

III.1. Synthèse enzymatique d'analogues de l'UDP-GalNAc

Dans la partie introductive, nous avons vu que de nombreuses stratégies, chimiques ou enzymatiques, ont été développées pour la synthèse de structures analogues de l'UDP-

GalNAc. Généralement, les modifications sur la partie sucre concernent principalement la position C-2 mais également le remplacement du groupement hydroxyle aux positions C-3, C-4 et C-6 par des groupements méthoxy (Busca *et al.*, 2003), le remplacement du *N*-acétyle par un *N*-trifluoroacétyle (Busca et Martin, 2004) ou encore l'incorporation d'un groupement biotinylé en C-6 (Bulter *et al.*, 2001). Malheureusement, les rendements faibles de synthèse et les difficultés liées à la purification des produits ne permettent pas dans la majorité des cas de tester les molécules en tant que substrats ou inhibiteurs d'enzymes.

Dans le chapitre I des résultats, nous avons reporté la synthèse enzymatique d'UDP-GalNAc. La méthode qui emploie trois enzymes pour la production du nucléotide sucre à partir de GalNAc commercial a prouvé son efficacité face aux méthodes purement chimiques. En outre, la cristallisation récente de la *N*-acétylgalactosamine kinase humaine (GK2) montre des différences significatives avec la galactokinase humaine (enzyme de la même famille qui catalyse la phosphorylation du Gal) en ce qui concerne la spécificité de substrat (Thoden et Holden, 2005). Les différences se situent au niveau des aminoacides impliqués dans l'interaction avec le groupement hydroxyle du carbone C-4 ainsi qu'au niveau des résidus interagissant avec le substituant du C-2 du sucre et laissent présager d'une spécificité de substrat plus large pour GK2. Ces informations offrent de nouvelles possibilités concernant la synthèse enzymatique de sucres et nous avons souhaité explorer la capacité des enzymes GK2 et AGX1 à accepter des substrats non naturels pour la production des UDP-sucres correspondants. Nous avons donc synthétisé plusieurs analogues de l'UDP-GalNAc, selon la méthode indiquée figure 40, afin qu'ils soient testés comme substrats donneurs ou inhibiteurs potentiels de la ppGalNAc-T1 bovine.

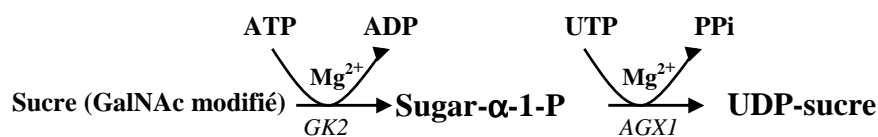


Figure 40. Synthèse d'analogues de l'UDP-GalNAc en deux étapes enzymatiques catalysées par GK2 et AGX1.

III.1.1. Choix et synthèse des analogues de GalNAc

Plusieurs travaux semblent indiquer que le groupement carbonyle sur le carbone 2 du saccharide est crucial pour la reconnaissance par les enzymes GK2 (Thoden et Holden, 2005) et ppGalNAc-T1 (Kubota *et al.*, 2006) et que les groupements méthoxy sont trop volumineux pour être introduits au C-3, C-4 et C-6 sans affecter de manière dramatique l'affinité de l'UDP-sucre pour la ppGalNAc-T1 (Busca *et al.*, 2003). Par conséquent, nous avons choisi de

conserver la fonction amide au carbone C-2 et avons modifié la chaîne R liée à cette fonction. Nous avons également modifié le substrat aux carbones C-4 et C-6 en synthétisant les sucres désoxy (figure 41). Les sucres (**1-5**), pour lesquels la chaîne R est modifiée, ont été obtenus chimiquement à partir du chlorhydrate de galactosamine et des anhydrides appropriés ou encore des acides lors d'un couplage standard à l'EDC. Les produits formés ont été purifiés sur colonne échangeuse d'ions ou gel de silice suivant le solvant utilisé pour la réaction.

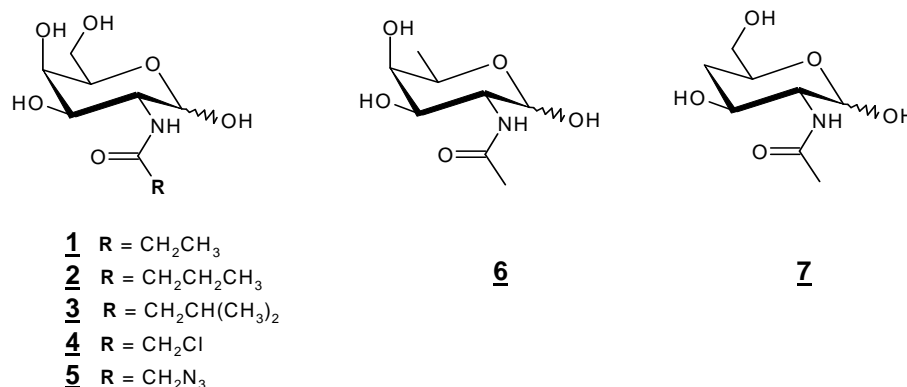


Figure 41. Précurseurs synthétiques des analogues de l'UDPGalNAc : GalNPropionyl (1), GalNButyryl (2), GalNisobutyryl (3), GalNChloroacetyl (4), GalNAzido (5), 6d-GalNAc (6), 4d-GalNAc (7)

Les composés désoxy sous forme protégée ont été synthétisés comme décrit dans la littérature (Busca et Martin, 2004) et les composés (**6** et **7**) ont été obtenus après deux étapes de déprotection (dépyvaloylation et débenzylation). Tous les produits ont été obtenus avec de bons rendements (50-80 %) sous forme d'un mélange d'anomères α et β et ont été dans un premier temps testés comme substrats de l'enzyme GK2.

III.1.2. Exploration du site catalytique de GK2

Chaque sucre de la figure 2 a été incubé avec l'enzyme GK2 à 37°C en présence de [³²P] ATP. Le produit de la réaction (sucre-1-P) est détecté et quantifié par mesure de radioactivité après séparation des espèces sur colonne échangeuses d'anions. La capacité de GK2 à accepter les composés et catalyser leur phosphorylation est représentée par la concentration en sucre-1-P formé dans le milieu en conditions de vitesses initiales (pas plus de 20 % du produit phosphorylé à la fin de l'incubation) et les valeurs de Km pour chacun des produits sont rassemblées figure 42. Pour les composés 3 et 6, le transfert de phosphate catalysé par GK2 est très faible, ce qui laisse supposer des valeurs de Km élevées (> 4,7 mM) si on compare avec le transfert et le Km calculé pour le composé 2. De manière générale, en ce qui concerne les substitutions sur le carbone 2, les chaînes aliphatiques contenant plus de 2 carbones sont de mauvais substrats. Le composé 1 semble tout de même mieux accepté par l'enzyme. Cependant, la légère hydrophobicité de ce composé conduit à une forte affinité pour le

support d'échange anionique de type styrène, ce qui rend l'élution difficile et la faible reproductibilité des résultats obtenus avec ce composé ne permettent pas de garantir sa qualité en tant que substrat. De meilleurs résultats ont été obtenus avec les chaînes contenant des atomes électro-négatifs (Cl ou N) suggérant la possibilité de liaisons hydrogènes avec le site catalytique favorables à la phosphorylation.

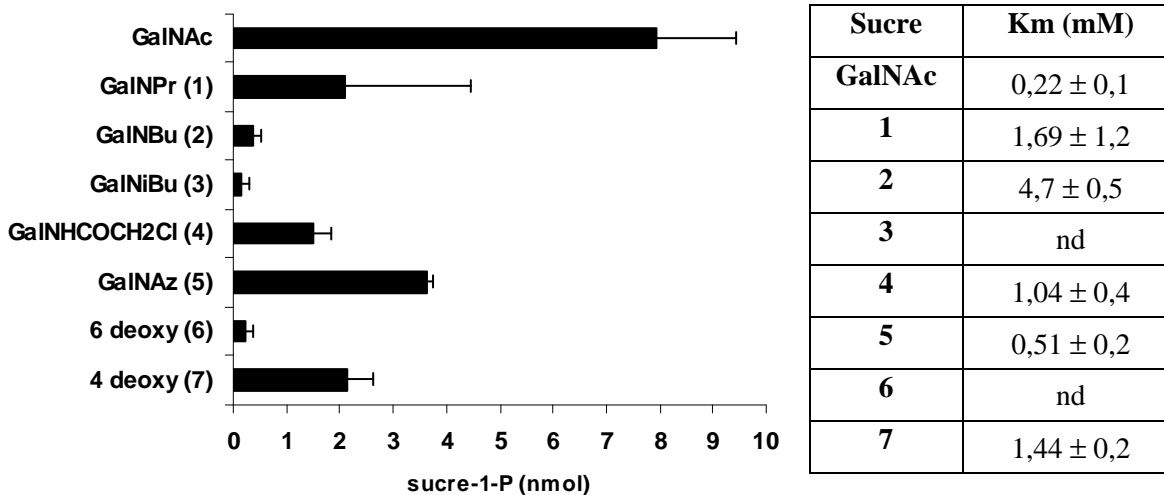


Figure 42. Capacité de GK2 à accepter divers substrats non naturels et valeurs de Km associées. nd, non déterminé.

Les sucres désoxy (en C-4 et C-6) montrent une affinité très différente pour l'enzyme. Alors que la présence d'un groupement hydroxyle au C-6 semble cruciale pour la phosphorylation, la forte affinité observée pour le 4d-GalNAc montre une permissivité de l'enzyme pour cette position. La galactokinase qui reconnaît le motif Gal mais pas le GalNAc possède un résidu Tyr en interaction avec l'hydroxyle du C-4. Le remplacement de cette Tyr par une Phe dans la séquence de GK2 pourrait expliquer cette permissivité (Thoden et Holden, 2005). Tous ces résultats concernant la spécificité de substrat de GK2 confirment sa haute spécificité pour le GalNAc pour lequel nous avons observé la plus forte activité mais n'excluent pas pour autant son utilisation pour la synthèse de sucres-1-P non naturels. Ainsi, nous avons cherché à savoir si les sucres-1-P pouvant être synthétisés avec GK2 pouvaient être substrats de l'uridyl transférase AGX1.

III.1.3. Exploration du site catalytique d'AGX1

La seconde étape critique pour parvenir aux analogues d'UDP-GalNAc est la conversion du sucre-1-P en UDP-sucre. Afin de déterminer quels sont les sucres pour lesquels la synthèse de l'UDP-sucre catalysée par GK2 et AGX1 était possible, les analogues (1-7) ont été incubés en présence de GK2, d'AGX1, et de PPA avec de l'ATP et du [³H] UTP à 37°C pendant 5h ou

15h. A la fin de l'incubation, le mélange est passé sur colonne échangeuse d'anions, ce qui permet la séparation du GalNAc-1-P n'ayant pas réagi et de l'UDP-sucre formé. La mesure par radioactivité des fractions éluées permet d'estimer la quantité des produits présents en fin de réaction et ainsi de comparer l'apparition des produits suivant le temps d'incubation comme illustré figure 4 pour les composés 4 et 7. Au bout de 5h, l'UDP-GalNAc et l'UDP-4d-GalNAc désoxy sont déjà présents en grande quantité (25-30 nmoles) avec conversion complète des sucres-1-P associés. En revanche, la synthèse d'UDP-GalNHCOCH₂Cl est moins efficace (10 nmoles de produit formé en 5h).

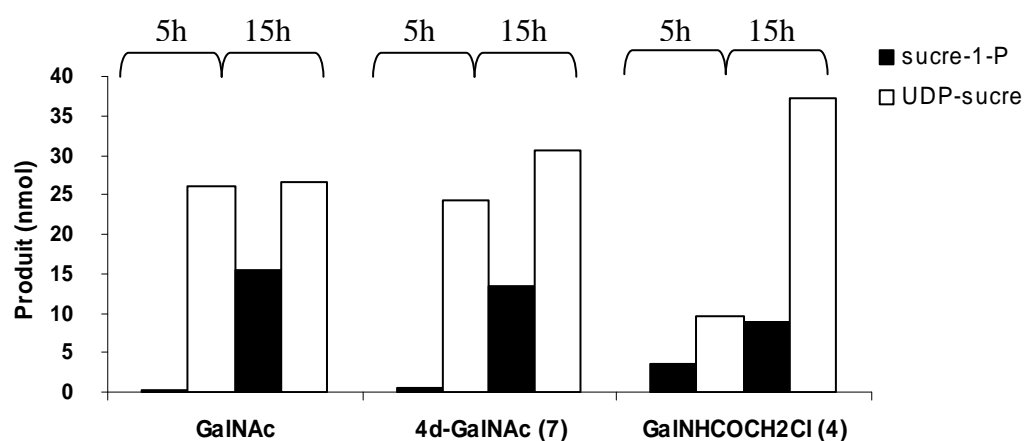


Figure 43. Quantification du sucre-1-P résiduel et de l'UDP-GalNAc formé pour les composés 4 et 7 à différents temps d'incubation (5h et 15h).

Lorsque l'on prolonge l'incubation à 15h, la quantité d'UDP-GalNAc produit n'augmente pas même si on observe une accumulation de GalNAc-1-P dans le milieu. Le même phénomène est observé pour le composé UDP-4d-GalNAc mais de manière surprenante, la production d'UDP-GalNHCOCH₂Cl augmente de manière significative entre 5h et 15h jusqu'à atteindre une valeur plus élevée que pour le substrat naturel (38 nmoles). La figure 44 montre les différences de production sur la nuit pour les différents UDP-sucres ainsi que les valeurs de K_m pour les sucres-1-P.

La première observation que nous pouvons faire est que l'enzyme AGX1 est moins spécifique du GalNAc-1-P que GK2 ne l'est pour le GalNAc, ce qui permet d'obtenir pour certains composés, les UDP-sucres dans des quantités similaires à l'UDP-GalNAc. Comme attendu avec les résultats de GK2, l'UDP-4d-GalNAc, l'UDP-GalNAz et l'UDP-GalNHCOCH₂Cl sont les plus enclins à être produits. Cependant, pour les analogues de GalNAc 1, 2 et 5, on observe une importante accumulation des sucres-1-P dans le mélange réactionnel et la conversion en UDP-sucre est difficile. Dans la littérature, très peu de données sont

disponibles sur le site actif de l'enzyme AGX1 et notamment sur la capacité d'accueil de la poche catalytique pour le sucre-1-P.

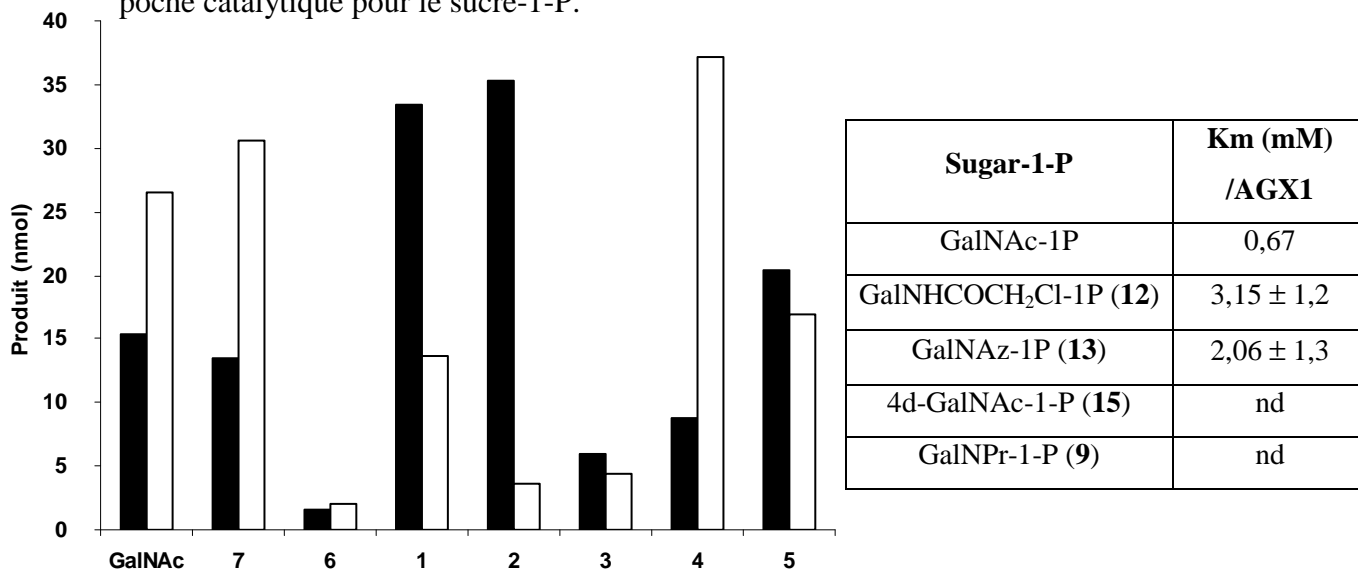


Figure 44. Evaluation de la production d'UDP-sucre à partir de sucres non naturels et des enzymes GK2, AGX1 et PPA. Les mélanges sont incubés 15 h à 37°C. Les sucres-1-P sont représentés en noir et les UDP-sucre en blanc.

Ces premiers résultats indiquent que l'enzyme AGX1 a une permisivité restreinte pour des modifications de ses substrats au niveau des constituants en position 2 puisque les sucres-1-P possédant des longues chaînes liées à l'amide ne sont pas ou très peu convertis en UDP-sucre. Le GalNHCOCH₂Cl se révélant être un bon substrat constitue cependant une exception qui provient probablement d'une interaction privilégiée avec l'enzyme via l'atome de chlore. En ce qui concerne les composés **3** et **6**, ils sont trop faiblement phosphorylés pour être de bons substrats de l'enzyme AGX1 et ne sont par conséquent pas de bons candidats pour la voie de biosynthèse alternative (GK2-AGX1). Ce résultat pour le 6d-GalNAc associé au travail publié sur le 6d-GalNAz par Bertozzi et collaborateurs confirme la nécessité de disposer d'un groupement hydroxyle en position 6 pour la formation d'UDP-sucre à partir d'analogues de GalNAc (Hang *et al.*, 2003).

III.1.4. Synthèse semi-préparative des UDP-sucre

Une synthèse à l'échelle du mg des analogues (**16-22**) de l'UDP-GalNAc a été réalisée en incubant des mélanges réactionnels de 2 mL à 37°C pendant la nuit. Une chromatographie échangeuse d'anions permet une purification rapide, séparant les produits d'intérêt, des nucléotides diphosphates et triphosphates résiduels. La purification par HPLC avec une colonne C18 élimine les nucléotide monophosphate issus de la dégradation ainsi que les sucres-1-P sortis sous le pic d'UDP-sucre lors de la purification par FPLC. Une étape finale

RÉSULTATS ET DISCUSSION

de gel filtration conduit au produit dessalé. Malheureusement, le 6d-GalNAc et le GalNBu n'étant pas substrats de GK2, nous n'avons pas pu synthétiser les UDP-sucre correspondant. Pour les composés pour lesquels la synthèse a fonctionné, les rendements avant et après purification ainsi que la caractérisation des produits formés par spectrométrie de masse sont réunis tableau XI.

Analogue	ESI , neg (Da)	Rdt avant purification (%)	Rdt après purification (%)
UDP-GalNAc	606.38	68	62
UDP-GalNPr (16)	620.15	87	48
UDP-GalNHCOCH₂Cl (19)	640.31	44	22
UDP-GalNAz (20)	647.15	56	16
UDP-4d-GalNAc (22)	590.32	39	6

Tableau XI. Récapitulatif des rendements de synthèse pour les divers analogues d'UDP-GalNAc et caractérisation par ESI.

Les produits ont également été caractérisés par RMN. L'attribution des signaux a nécessité des analyses à 2 dimensions ¹H-¹H COSY, ¹H-¹H TOCSY, ¹H-¹³C HSQC et ¹H-¹³C HMBC accumulées sur une dizaine d'heures comme illustré dans le tableau XII.

	UDP-GalNPr (16)	UDP-GalNHCOCH ₂ Cl (19)	UDP-GalNAz (20)	UDP-4d-GalNAc (22)
T (°C)	25	5	5	25
proton	ppm	ppm	ppm	ppm
1	5,54	5,19	5,19	5,45
2	4,26	3,91	3,91	3,76
3	3,97	3,66	3,61	3,91
4	4,04	3,63	3,65	1,95 ; 1,47
5	4,20	3,81	3,81	4,14
6	3,75 ; 3,77	3,36 ; 3,39	3,39 ; 3,36	3,59 ; 3,50
1'	5,99	5,60	5,60	5,87
2'	4,37	3,99	3,98	4,25
3'	4,37	3,99	3,98	4,25
4'	4,29	3,91	3,92	4,17
5'	4,26 ; 4,20	3,86	3,87 ; 3,81	4,12 ; 4,08
5''	5,97	5,58	5,58	5,85
6''	7,96	7,60	7,59	7,84
NCOR	1,12 (CH ₃), 2,36 (CH ₂)	3,82 ; 3,91 (CH ₂)	3,76 (CH ₂)	1,97 (CH ₃)

Tableau XII. Attribution des signaux pour les différents analogues d'UDP-GalNAc synthétisés.

Les résultats indiquent que la synthèse enzymatique dans un volume réactionnel 80 fois plus important conduit pour tous les composés à de bons rendements avant purification (39% à 87%), avec cependant une contradiction avec les prédictions que l'on aurait pu faire d'après les données recueillies précédemment pour les mélanges de 50 μ L. Certains UDP-sucres semblent plus difficiles à purifier que d'autres : notamment le composé **20** (UDP-GalNAz) a donné un mauvais rendement de purification par HPLC (50 %) et seule une petite partie du composé **22** (UDP-4d-GalNAc) a été récupéré après l'étape de gel filtration. Néanmoins, les quantités recueillies pour chaque produit (de 1 à 9 mg pour 7 mL de mélange réactionnel) sont suffisantes pour une évaluation biologique.

III.2. Evaluation biologique des analogues

Outre les 4 produits synthétisés précédemment, nous disposons également du produit 3d-UDP-GalNAc synthétisé par voie purement chimique dans l'équipe d'Olivier Martin (ICOA, Orléans, Busca et Martin, 2004). L'évaluation biologique des composés consiste à effectuer des tests de transfert du monosaccharide modifié ou des tests d'inhibition du transfert de GalNAc.

III.2.1. Test de transfert du monosaccharide modifié

Afin de déterminer si les différents UDP-sucres synthétisés sont substrats donneurs ou non de la ppGalNAc-T1, des essais de transfert ont été réalisés sur le peptide accepteur (STP)₅AG. Les UDP-sucres ont été introduits en défaut (1/2) par rapport au nombre de sites glycosylables afin de pouvoir comparer les différents ligands. Les mélanges sont incubés la nuit à 37°C en présence de l'enzyme CIP qui déphosphoryle l'UDP au fur et à mesure de sa formation. Les mélanges réactionnels sont ensuite analysés par spectrométrie de masse (MALDI-TOF, mode positif) sans être purifiés (figure 45). Le peptide nu a une masse (m/z) de 1570 Da. Sur l'ensemble des spectres où l'espèce non glycosylée est présente, il apparaît sous sa forme ionisée avec du sodium (1593,9 Da). Les masses retrouvées sur les spectres indiquent qu'excepté l'UDP-(4d)-GalNAc, pour lequel aucun transfert n'est observé, tous les autres nucléotides sucres testés sont substrats donneurs de l'enzyme.

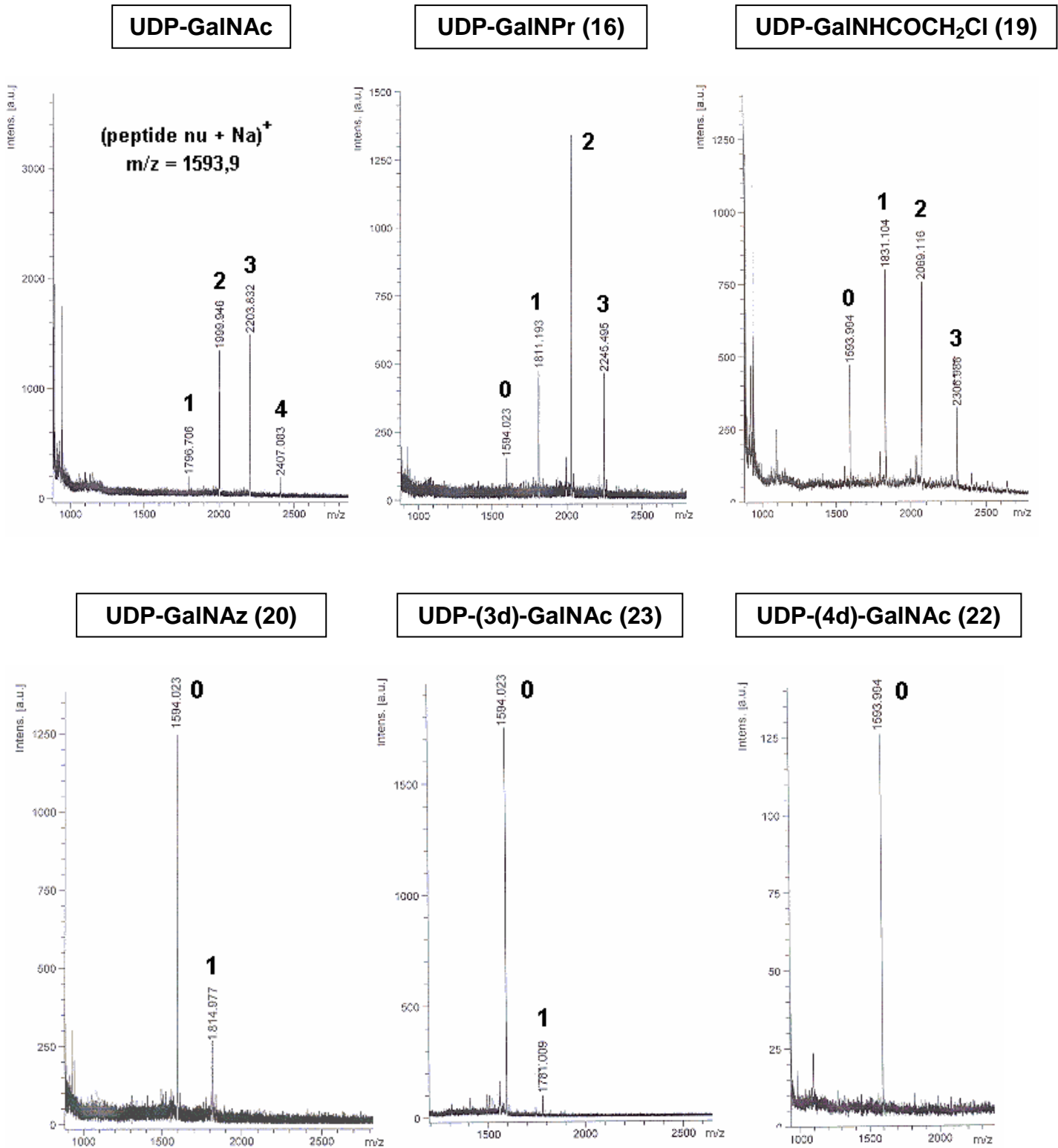


Figure 45. Spectres de masse correspondant aux incubations avec les différents UDP-sucre et la ppGalNAc-T1. Les échantillons sont analysés au MALDI-TOF en mode linéaire positif.

Pour les substrats donneurs, l'intensité relative des pics correspondant au peptide plus ou moins glycosylé permet d'évaluer le nombre moyen d'unités saccharidiques incorporées par peptide. Les expériences ont été répétées trois fois et la moyenne de ce nombre sur les trois

expériences est reportée figure 46. Ces résultats permettent de comparer de manière significative la capacité des différents analogues à transférer leur partie monosaccharidique.

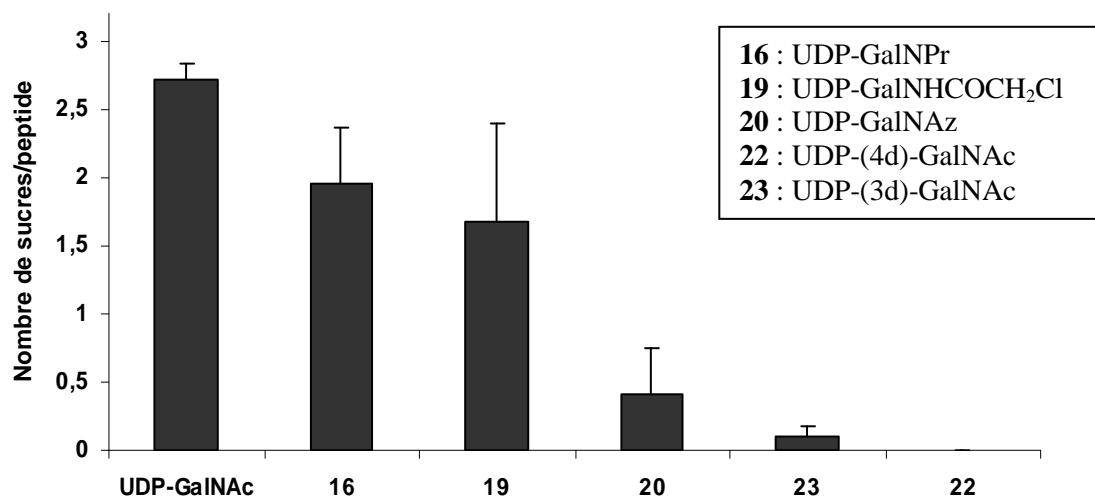


Figure 46. Histogramme représentant le transfert de monosaccharide des divers ligands sur le peptide accepteur $(STP)_5AG$ avec la $ppGalNAc-T1$.

L'UDP-GalNAc reste le meilleur substrat donneur pour l'enzyme. Les modifications apportées au C-2 conduisent à une réduction du transfert plus ou moins importante selon le composé (baisse de 36 %, 53 % et 91 % respectivement pour les composés **16**, **19** et **20**). Le groupement azidoacétamido du composé **20** est beaucoup plus rigide que le groupement acétamido et une hypothèse possible à cette réduction du transfert est la conformation contrainte du ligand **20** dans la poche catalytique. Le taux de transfert pour les composés **16** et **19** reste raisonnable (jusqu'à 3 motifs incorporés) et montre que la partie du site actif englobant la chaîne liée au carbone 2 peut accueillir des groupements plus volumineux que le groupement acétamido tout en conservant l'activité enzymatique.

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, le GalNAz, par sa facilité de repérage après réaction avec la phosphine, est déjà utilisé comme succédané du GalNAc pour étudier les voies métaboliques empruntées par le GalNAc *in vivo*. Le GalNAz, incorporé aux cellules sous sa forme *O*-acétylée, est rapidement converti en UDP-GalNAz par action catalytique des enzymes GK2 et AGX1 présentes naturellement dans les cellules de mammifères et incorporé aux protéines par les différentes $ppGalNAc-Ts$ (Hang *et al.*, 2003). Le repérage aisé des peptides et protéines porteurs de GalNAz a également été mis à profit pour étudier la spécificité de substrat peptidique de diverses $ppGalNAc-Ts$ recombinantes (Pratt *et al.*, 2004). Cependant, les essais de transfert que nous avons réalisés avec l'UDP-GalNAz sur des substrats et enzymes purifiés sont médiocres et la différence d'incorporation entre le GalNAz et le GalNAc est telle qu'elle pourrait remettre en cause la fiabilité du GalNAz comme

remplaçant du GalNAc. Bien que la valeur de K_m pour l'UDP-GalNAz dans la littérature soit faible (7,68 μM , Hang *et al.*, 2004a), ceci n'en fait pas pour autant un bon substrat de l'enzyme et nos résultats montrent que d'autres dérivés comme les composés **16** et **19** sont de biens meilleurs substrats donneurs pour la ppGalNAc-T1 ; l'utilisation de ces molécules à la place de l'UDP-GalNAz reflèterait certainement de manière plus réaliste ce qui se passe avec l'UDP-GalNAc. La difficulté est néanmoins de trouver un moyen de repérer facilement ces produits.

L'absence ou quasi-absence de transfert observée pour les composés **22** et **23** témoigne de l'importance du rôle joué par les groupements hydroxyles aux carbones C-3 et C-4. Ce rôle peut être structural, s'il s'agit d'éléments nécessaires pour la fixation du ligand à l'enzyme, et/ou mécanistique si le groupement agit comme intermédiaire dans le transfert. Une étude plus poussée sur les interactions mises en jeu entre la protéine et le ligand permettrait d'être plus précis quand à la nature du rôle joué par ces hydroxyles, c'est ce que essayerons de déterminer dans le chapitre III.3. Il semble plus particulièrement que l'absence de ce groupement en position 4 soit rédhibitoire à l'activité enzymatique, ce qui n'est pas surprenant puisque c'est une GalNAc-Transférerase et non une GlcNAc-Transférerase. Il reste à déterminer si cet analogue rentre dans la poche catalytique et conduit à une inhibition ou si l'absence du groupement hydroxyle empêche sa fixation au site. Afin de lever cette ambiguïté, nous avons donc réalisé des tests d'inhibition avec les divers analogues.

III.2.2. Estimation des constantes d'inhibition

Le calcul des constantes d'affinité K_m des différents analogues d'UDP-GalNAc pour la ppGalNAc-T1 nécessite de disposer des UDP-sucres radiomarqués sur la partie saccharidique. Il serait envisageable de produire ces composés radioactifs mais il faudrait pour cela synthétiser tous les analogues de GalNAc à partir de galactosamine et des acides ou anhydrides radioactifs correspondants, ce qui est très coûteux.

Disposant des UDP-sucres non radioactifs, nous avons donc réalisé des tests d'inhibition qui sont aussi informatifs que les constantes d'affinité K_m . Les tests d'inhibition apportent de nombreuses informations quant à l'affinité du ligand vis-à-vis du site actif de l'enzyme et représentent des outils précieux pour bloquer et cristalliser l'enzyme en présence d'un substrat non clivable. Le calcul des constantes d'inhibition pour la ppGalNAc-T1 et l'UDP-GalNAc a été entrepris à partir d'expériences réalisées (en triple) à 37°C pendant 20

min avec diverses concentrations en inhibiteurs et UDP-GalNAc radioactif. Pour chaque composé et pour chaque concentration en UDP-GalNAc testée, les droites $1/V = f([I])$ et $[S]/V = f([I])$ sont tracées avec un bon coefficient de corrélation ($R > 0,982$) comme illustré figure 47 pour le composé **19**. I représente l'inhibiteur, S le substrat UDP-GalNAc et V, les vitesses initiales. L'allure générale des graphes est la même pour tous les ligands et la zone d'intersection des droites dans ces deux représentations montre qu'il s'agit d'inhibitions mixtes. Dans ce genre d'inhibition, l'inhibiteur se lie à la fois avec l'enzyme libre (inhibition compétitive) et avec l'enzyme liée au substrat (inhibition incompétitive), mais avec des affinités différentes. Ce type d'inhibition est par exemple fréquemment rencontré lorsque l'un des produits libérés par l'enzyme après catalyse génère une forme de l'enzyme différente de celle qui fixe le substrat. C'est certainement le cas avec l'UDP, sous produit de la réaction qui induit alors une inhibition anti-compétitive. Si on ajoute l'inhibition compétitive liée au ligand introduit dans le mélange, on a bien affaire à une inhibition mixte.

L'intersection des droites permet d'accéder aux constantes d'inhibition. Celle qui nous intéresse est la constante K_{ic} pour constante d'inhibition compétitive, elle peut être estimée d'après le graphe de gauche. La précision sur la valeur du K_i par cette méthode peut varier d'un facteur 2 et il faudrait multiplier le nombre d'expériences pour atteindre une valeur d'une plus grande précision.

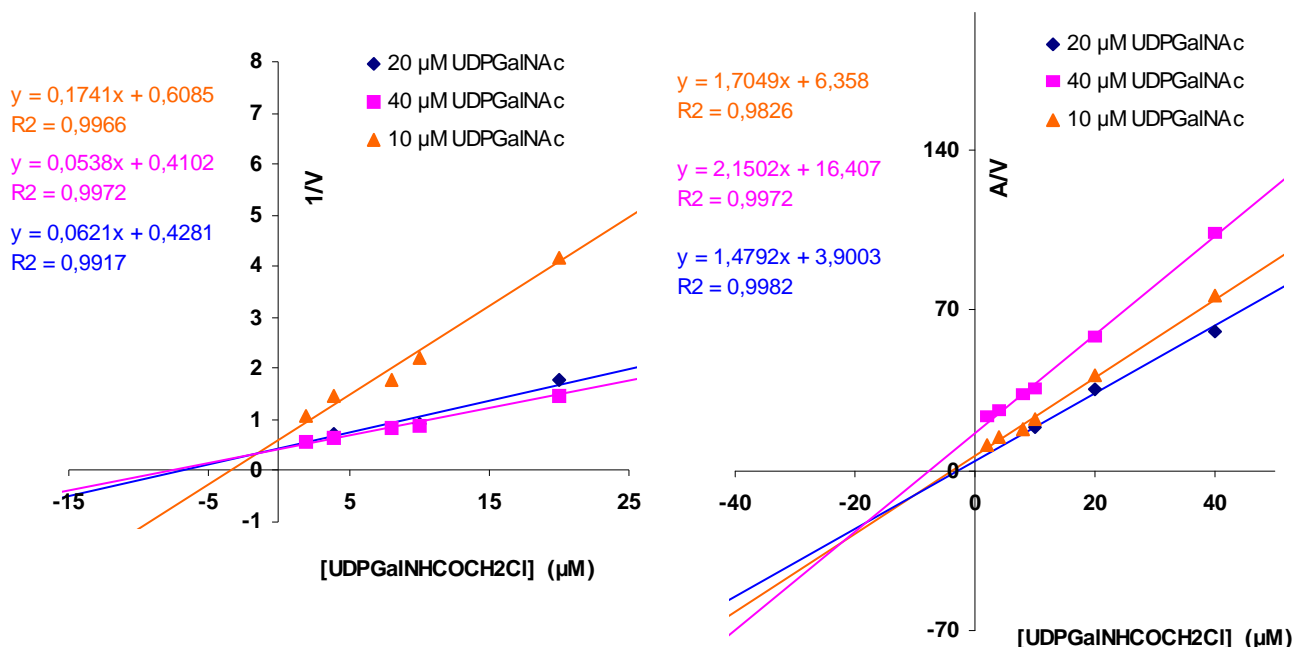


Figure 47. Exemple de détermination des constantes lors du transfert de GalNAc par la ppGalNAc-T1 en présence du composé **19**. Représentation des graphes $1/V = f([I])$ à gauche et $[S]/V = f([I])$ à droite où I représente l'inhibiteur, A le substrat UDP-GalNAc et V, les vitesses initiales.

Néanmoins, avec trois expériences, on obtient un ordre d'idée de la valeur de K_i , ce qui nous permet de déterminer si l'inhibiteur est bon, moyen ou mauvais. Les valeurs de K_i pour les 5 molécules testées (**16**, **19**, **20**, **22** et **23**) sont reportées dans le tableau XIII. La valeur de K_i pour l'UDP-GalNAz (7,0 μM) est comparable à la valeur de K_m donnée pour ce produit dans la littérature (7,68 μM , Hang *et al.*, 2004a). Les valeurs de K_i estimées pour les différents ligands (1,7 μM à 14,5 μM), du même ordre de grandeur que le K_m de l'enzyme pour l'UDP-GalNAc (9 μM) montrent que les molécules testées sont de très bons inhibiteurs à l'exception de l'UDP-3d-GalNAc qui présente un K_i un peu plus élevé (40 μM). Le composé 3-désoxy possède néanmoins un meilleur pouvoir inhibiteur que l'UDP pour lequel la valeur de K_i est de 200 μM .

Analogue	K_i (μM)
UDP-GalNAc	-
16	$2,9 \pm 0,2$
19	$1,7 \pm 0,3$
20	$7,0 \pm 0,6$
22	$14,5 \pm 1,5$
23	40 ± 4

Tableau XIII. Estimation des valeurs de la constante K_{ic} pour les différents analogues

Ces résultats apportent une réponse aux interrogations sur le rôle des hydroxyles en C-3 et C-4. Nous avons vu précédemment que le composé 4-désoxy ne conduit à aucun transfert. D'autres travaux sur le ligand UDP-GlcNAc mènent à la même conclusion pour ce composé (Wandall *et al.*, 1997). Il semble donc que le groupement hydroxyle en C-4 soit déterminant pour le transfert. Les résultats d'inhibition montrent que ce groupement en C-4 n'est cependant pas essentiel pour la reconnaissance du substrat par l'enzyme ($K_i = 14,5 \mu\text{M}$). Le groupement hydroxyle en position 3 semble jouer un rôle différent : il ne semble pas intervenir dans le mécanisme de transfert (le composé 3 désoxy est substrat donneur) mais plutôt dans l'interaction protéine-ligand puisqu'en son absence, l'affinité se trouve réduite d'un facteur 4. Parmi les 4 composés possédant la plus faible valeur de K_i , l'UDP-4d-GalNAc est le seul à véritablement inhiber l'activité enzymatique (aucun transfert) et constitue donc un candidat idéal pour cristalliser l'enzyme en présence d'un substrat non clivable. Les expériences de transfert *in vitro* et les tests d'inhibition permettent de faire un premier lien entre l'activité enzymatique et les groupements fonctionnels du ligand. Néanmoins ces expériences ne permettent pas de déterminer au sein d'un ligand les groupements les plus en contact avec l'enzyme et sont très peu informatifs quant à la conformation du substrat dans la poche catalytique. Afin d'étudier de manière plus précise les interactions protéine-ligands, nous avons eu recours à la STD-NMR.

III.3. Analyse STD-NMR de plusieurs ligands

C'est en collaboration avec C. Landon et H. Meudal du groupe de Françoise Vovelle, *RMN et modélisation moléculaire des protéines et peptides* au CBM (Orléans), que ces expériences ont pu être réalisées. L'analyse STD permet de déterminer l'implication relative des protons d'un ligand dans son interaction avec le site actif d'une protéine. A l'heure actuelle, le mécanisme catalytique de la ppGalNAc-T1 est encore une énigme. Nous savons que lors du transfert de GalNAc, il y a rétention de la configuration au carbone anomérique, mais la grande interrogation repose sur le mécanisme chimique employé pour la formation de la liaison glycosidique. Plusieurs hypothèses ont été avancées pour tenter d'expliquer ce mécanisme de rétention : certains proposent des intermédiaires covalents ou encore un mécanisme S_Ni alors que d'autres penchent plutôt pour des états de transition de type oxocarbenium mais aucune preuve expérimentale n'a pu pour le moment confirmer l'une ou l'autre de ces hypothèses (Unligil et Rini, 2000, Davies, 2001, Ly *et al.*, 2002). Afin d'obtenir plus d'informations sur l'interaction substrat-enzyme, des expériences de STD ont été réalisées avec divers ligands et la ppGalNAc-T1 bovine.

Le principe de la méthode est détaillé dans le chapitre «matériel et méthode » mais il convient de rappeler brièvement que le spectre STD résulte de la différence entre un spectre du ligand réalisé en conditions de saturation des signaux de la protéine et un spectre 1D du ligand obtenu sans saturation. Pour ne faire apparaître sur le spectre STD que les signaux des protons du ligand qui sont en interaction avec l'enzyme, il faut irradier sélectivement la protéine (l'effet de saturation se propage ensuite au ligand). Pour l'irradiation, le champ de radio-fréquence doit se situer dans une zone où aucun des protons du ligand ne résonne et on irradie en général entre +1 et -1 ppm (protons d'un groupement méthyle) ou encore entre 6,5 et 8 ppm (protons aromatiques). Dans notre cas, les ligands sont des UDP-sucres. La présence d'un cycle aromatique ne permet donc pas d'irradier entre 6,5 et 8 ppm. En revanche, seul un des UDP-sucres que nous avons synthétisés possède un groupement méthyle, ce qui laisse la possibilité des tester les 3 autres ligands si on décide d'irradier les méthyles. C'est donc à la fréquence de résonance de ce groupement qu'a été effectuée la saturation.

L'enzyme que nous souhaitons étudier remplit toutes les conditions requises pour ce type d'expérience (Meyer et Peters, 2003) : le temps de résidence du ligand dans la poche catalytique est suffisamment important et permet au ligand fixé d'emmagasiner un maximum de saturation. Les ligands sont de taille inférieure à 5 kDa et la protéine a un poids

RÉSULTATS ET DISCUSSION

moléculaire supérieur à 30 kDa. La nature du cofacteur (ion divalent) utilisé lors du transfert de GalNAc dans les dosages enzymatiques est le seul paramètre qu'il a fallu modifier. En effet l'enzyme est complètement inactive en absence de métal et catalyse le transfert de manière optimale avec le Mn^{2+} . Mais cet ion paramagnétique est incompatible avec l'analyse par RMN et doit être remplacé par un autre ion métallique. Une étude préliminaire réalisée par dosage radioactif a montré que l'emploi du Cd^{2+} permettait de conserver 55 % de l'activité enzymatique obtenue en présence de Mn^{2+} .

Les échantillons RMN contiennent le ligand et la protéine en présence du cofacteur Cd^{2+} , dans les conditions de pH et de force ionique appropriées. Les expériences ont dans un premier temps été réalisées à 25°C. En effet l'enzyme opère habituellement à 37°C mais à cette température, le substrat est en grande partie clivé après un temps d'incubation de quelques heures nécessaire à l'acquisition des spectres RMN. Cependant, des analyses préliminaires effectuées en RMN ^{31}P et en spectrométrie de masse ont montré qu'à 25°C et dans les conditions utilisées en STD-NMR (fortes concentrations en enzyme et en substrat), l'UDP-GalNAc, substrat naturel de l'enzyme, était déjà rapidement hydrolysé en UDP et GalNAc (45 % de dégradation au bout de 4 h). Puis l'UDP perd facilement ses groupements phosphates pour générer l'UMP qui est enfin dégradé en uridine, ce qui multiplie les signaux sur le spectre et rend impossible l'interprétation de l'analyse STD. Pour d'autres ligands testés à cette température (UDP-Gal, UDP-GlcNAc, UDP-4d-GalNAc, UDP-GalNAz), ce phénomène d'hydrolyse n'a pas été observé, certainement parce que ces molécules ne sont pas substrats donneurs de l'enzyme ou faiblement. Pour pallier ce problème d'hydrolyse, une autre série d'expériences a été menée à 5°C. À cette température, l'hydrolyse de l'UDP-GalNAc est considérablement réduite (moins de 15 % après 4h), ce qui permet, en un temps raisonnable d'acquisition (4 h), d'obtenir un spectre STD interprétable. En outre, l'analyse des autres ligands montre une amélioration du rapport signal/bruit à 5°C due à des échanges plus lents entre la protéine et le ligand. Nous avons donc réalisé la plupart des expériences à 5°C afin de pouvoir disposer du substrat naturel UDP-GalNAc comme molécule de référence et d'avoir des signaux suffisamment intenses pour pouvoir évaluer de manière précise l'interaction relative des protons des ligands.

La figure 48 représente le spectre de référence de l'UDP-GalNAc avec l'attribution des signaux pour les différents protons ainsi que trois spectres issus des expériences STD.

UDP-GalNAc - Spectre de référence

RÉSULTATS ET DISCUSSION

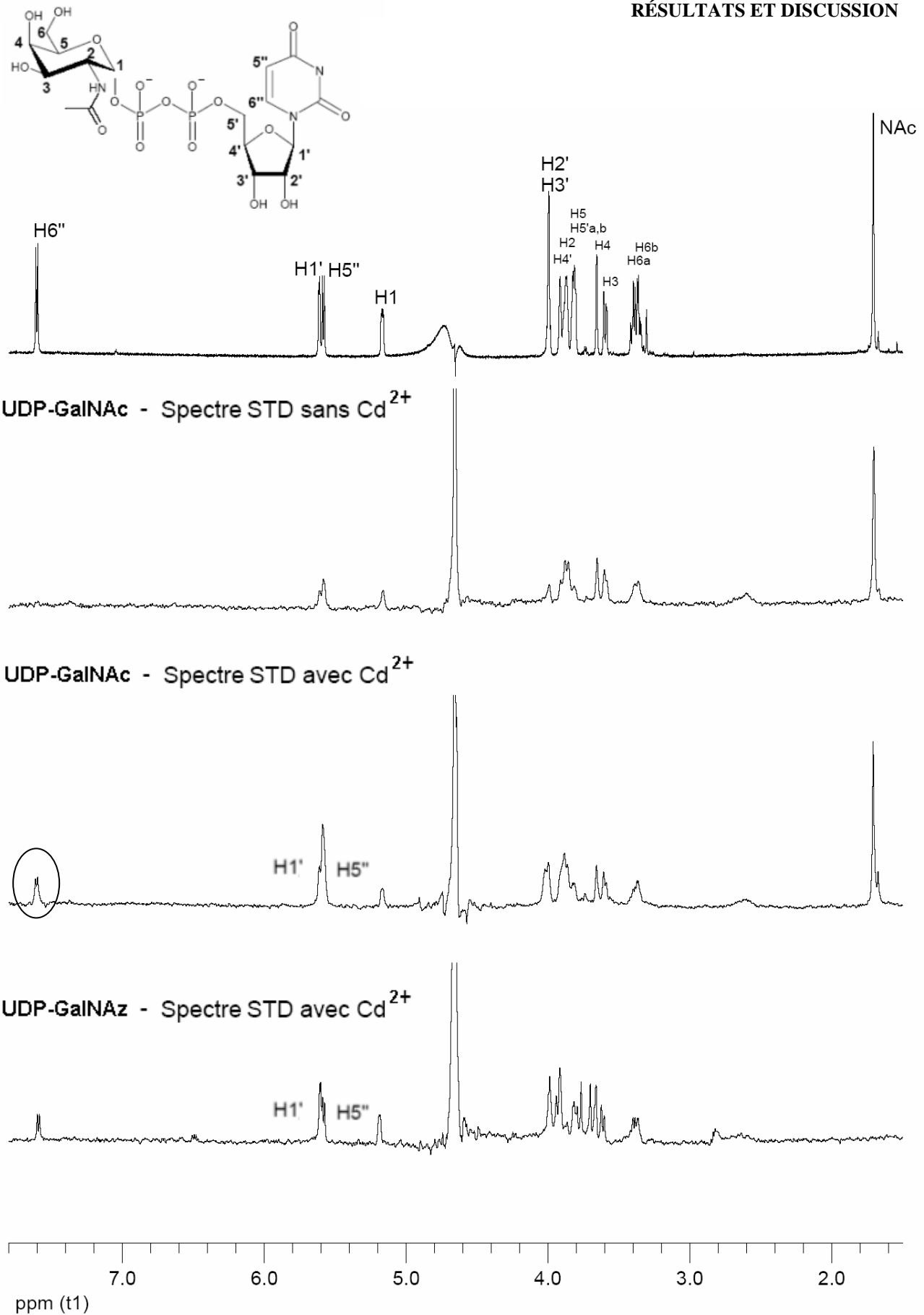


Figure 48. Analyse par STD-NMR de l'interaction de l'UDP-GalNAc et de l'UDP-GalNAz avec l'enzyme ppGalNAc-T1. Spectre 1 : spectre de référence (sans saturation) de l'UDP-GalNAc ; Spectres 2 et 3 : spectres STD de l'UDP-GalNAc sans et avec ion divalent cofacteur (Cd^{2+}) ; Spectre 4 : spectre STD de l'UDP-GalNAz avec ion divalent cofacteur.

Pour chaque ligand, la confrontation du spectre 1D avec le spectre issu de l'expérience STD permet d'évaluer un rapport d'intensité entre les deux spectres pour chacun des protons. Les protons du ligand les plus impliqués dans l'interaction sont ceux pour lesquels l'intensité du pic se rapproche le plus de celle observée sur le spectre 1D.

L'UDP-GalNAc a été testé en présence ou non du métal cofacteur et les spectres obtenus indiquent clairement une perte du signal pour le proton aromatique H6'' et une diminution de l'intensité du proton H5'' en absence de cofacteur. L'ion divalent semble donc favoriser l'interaction de l'uridine avec l'enzyme. Une autre expérience réalisée avec de l'UDP (non montré ici) confirme ce résultat puisqu'en l'absence de cofacteur aucun signal STD n'apparaît pour cette molécule. Si on compare maintenant le spectre de l'UDP-GalNAc avec celui de l'UDP-GalNAz, on remarque nettement une inversion dans l'intensité relative des protons H5'' et H1'. L'UDP-GalNAc est le substrat naturel de l'enzyme alors que les tests de transfert *in vitro* ont montré que l'UDP-GalNAz était un substrat très faiblement donneur. Cette inversion dans l'interaction de l'enzyme avec ces deux protons suivant que le ligand est substrat donneur ou non pourrait conduire à l'hypothèse d'une conformation du ligand nécessaire pour une interaction avec l'enzyme permettant alors un transfert efficace.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons testé divers UDP-sucres substrats donneurs ou non de l'enzyme à savoir l'UDP-Gal, l'UDP-GlcNAc, l'UDP-4d-GalNAc, l'UDP-GalNAz, l'UDP-GalNHCOCH₂Cl et l'UDP-GalNAc ainsi qu'un fragment du substrat naturel, le GalNAc-1-P. Le rapport d'intensité entre le spectre STD et le spectre de référence est évalué pour chacun des protons. En prenant comme 100% le rapport le plus élevé (fort contact avec l'enzyme), il est possible de classer les différents protons du ligand dans 4 catégories distinctes (0-25%, 26-50%, 51-75%, 76-100%) selon leur proximité avec l'enzyme (tableau XIV). Les protons en vert sont ceux du cycle aromatique de l'uridine, ceux en bleu appartiennent au ribose et les protons en rose représentent la partie monosaccharidique (figure 49). Les UDP-sucres sont des molécules complexes présentant de nombreux signaux en RMN du proton et pour cette raison, certains signaux se trouvent superposés. Pour les protons associés à ces signaux, il est alors impossible de déterminer la catégorie à laquelle ils appartiennent.

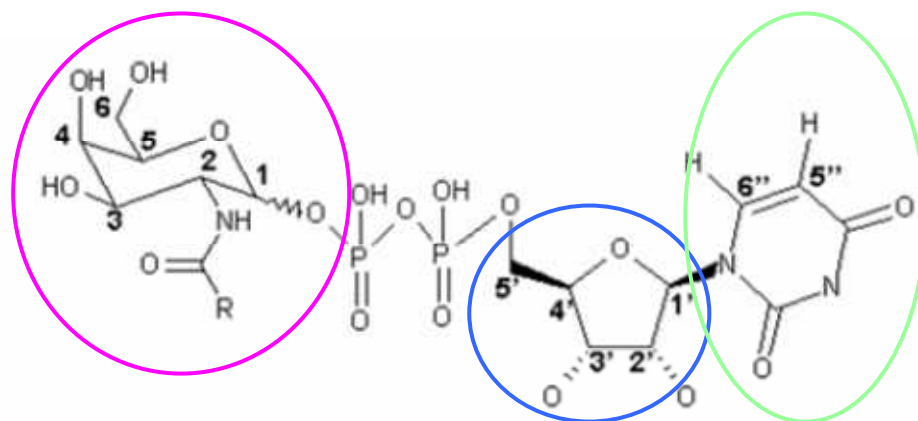
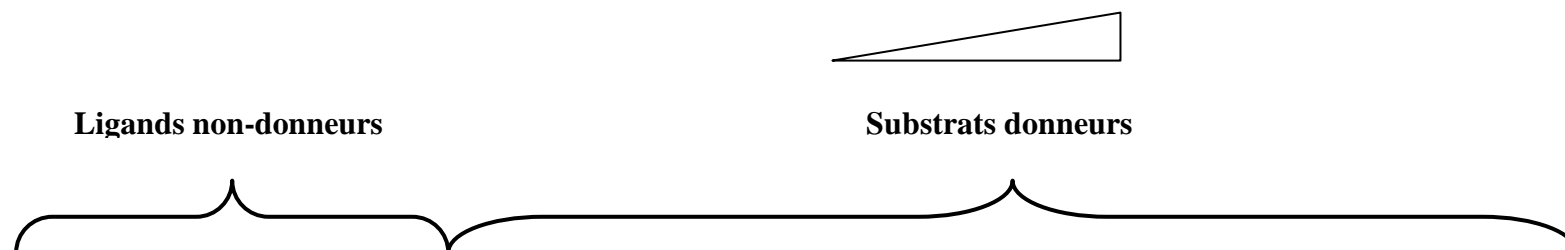


Figure 49. numérotation des protons des ligands analogues de l'UDP-GalNAc



Contact avec l'enzyme	UDP-GlcNAc 5°C	UDP-GalNAc4désoxy 25°C	UDP-Gal 25°C	UDP-GalNAz 5°C	UDP-GalNHCOCH ₂ Cl 5°C	UDP-GalNAc (5°C)		GalNAc-1-P (5°C) (sans métal)
						Avec métal	Sans métal	
+++ (76-100%)	H1'	H1'	H1'	H1' H5'' H3 H4	H3 H4 H5'	H5''	H3 NAc H4	H2
++ (51-75%)	H4' H5''	-	H5''	H1 NAz	H6 H1' H5'' H1		H5'' H2 H6	H5 NAc
+ (26-50%)	H5' H1 H5	H2 H5 H4' H5' H5''	H4 H4' H5'	H6 H6''	H6''	H4 H6'' NAc H1' H6 H1	H1 H1'	H3 H4 H6
± (0-25%)	H2 H4 H6'' NAc	H1 H3 H6 H6'' NAc	H1 H2 H3, H5 H6 H6''	-	-		-	H1
Aucun contact	-	-	-	-	-	-	H6''	-
Signaux superposés ^a	H3 H6 H2' H3'	H4 H2' H3'	H2' H3'	H2 H5 H2' H3' H4' H5'	H4' H2' H3' CH ₂ Cl H5 H2	H4' H5' H2' H3' H2 H3 H5	H4' H5' H2' H3' H5	-

Tableau XIV. Analyse STD des ligands : implication relative des protons dans l'interaction avec l'enzyme.

a. les signaux de certains protons se superposent ce qui rend impossible l'attribution de l'intensité.

Quand on compare les divers ligands en présence de métal, pour les non donneurs (UDP-GlcNAc et UDP-4d-GalNAc), ou pour l'UDP-Gal (qui est un faible donneur) c'est le proton H1' du ribose qui est en interaction privilégiée avec l'enzyme. Le proton H5'' de l'uridine et d'autres protons du ribose (H4' et H5') semblent également bien ancrés à l'enzyme alors que la N-acétylosamine est moins en contact avec l'enzyme. En revanche, pour les substrats (UDP-GalNAz, UDP-GalNHCOCH₂Cl et UDP-GalNAc), on observe que l'interaction prépondérante de l'enzyme avec H1' par rapport à H5'' est progressivement remplacée par une interaction prépondérante de H5'' par rapport à H1', amenant à l'hypothèse qu'un bon substrat doit nécessairement avoir une bonne interaction de la base avec l'enzyme. D'autre part, on note peu de contacts pour l'UDP-Gal entre le motif galactose et l'enzyme, alors que pour l'UDP-GalNAz et l'UDP-GalNHCOCH₂Cl les protons du dérivé GalNAc présentent des interactions relativement fortes. Nous remarquons aussi que l'interaction avec la chaîne N-acétyle ou NAz devient prépondérante pour les bons substrats (cependant pour l'UDP-GalNHCOCH₂Cl, il n'a pas été possible d'attribuer une intensité car le signal est superposé). De même, l'UDP-GalNAc montre une interaction relativement importante au niveau du GalNAc mais seulement en l'absence de métal, ce qui peut paraître surprenant pour une enzyme qui a besoin du métal pour son activité de transfert. Il faut cependant préciser que la représentation montrée ici ne donne aucune idée de la valeur « absolue » de l'intensité des signaux STD et il est tout-à-fait possible que l'intensité relativement faible (par rapport au H5'') des interactions du motif GalNAc avec la protéine en présence de métal soit malgré tout plus importante que celle des protons du GalNAz, par exemple. Pour tous les ligands, les protons H2' et H3' du ribose sont superposés, il n'est donc pas possible de dire si l'un de ces protons interagit plus que l'autre. En revanche, le fait que l'on observe un signal pour ces deux protons montre qu'ils sont bien ancrés dans le site actif, ce qui paraît logique si on considère le contact élevé entre l'enzyme et les protons H1', H4' et H5' pour les ligands UDP-GlcNAc, UDP-4dGalNAc et UDP-Gal.

Pour les autres ligands, la présence de signaux correspondants au ribose atteste là-aussi d'une interaction avec l'enzyme mais, à part pour le signal du proton H1' qu'on peut quantifier, il n'est pas possible d'avoir d'autres informations. Nos expériences préliminaires confirment donc l'existence d'une structure des substrats nécessaire au transfert qui implique à la fois la présence de la chaîne N-acétyle sur le motif Gal et d'un hydroxyle en position axiale en 4 du Gal. Ces résultats ne sont bien évidemment pas nouveaux mais ils prouvent que la technique de STD-NMR est fiable et permet d'observer effectivement des contacts spécifiques révélateurs de la reconnaissance enzyme/substrat. Ces expériences ont donc

permis de commencer à mettre au point les conditions nécessaires pour appliquer la STD-NMR à l'étude enzymatique qui nous intéresse.

De plus, les quelques essais effectués en omettant le métal montrent que la conformation adoptée par l'UDP-GalNAc ou par l'enzyme en présence du Cd^{2+} est favorable à un contact privilégié de l'enzyme avec l'uracile. Par contre, le spectre STD de l'UDP-GalNHCOCH₂Cl ne change pratiquement pas (non montré ici) en absence de métal ce qui pourrait indiquer que la conformation de cet analogue en absence de métal est proche de celle qu'adopte l'UDP-GalNAc en présence de métal ou que l'enzyme n'a pas besoin de métal pour le reconnaître. Dans une autre partie de ce chapitre (III.2.2) nous avons vu que l'UDP-GalNHCOCH₂Cl était un bon inhibiteur de l'activité de l'enzyme et aussi un bon donneur. Il y a donc là un ensemble d'études à entreprendre pour comprendre comment cet inhibiteur peut mimer l'UDP-GalNAc dans le site.

Une des hypothèses que nous formulons en ce qui concerne la conformation que l'UDP-GalNAc doit adopter dans le site pour qu'il y ait transfert correspond à une forme assez coudée de l'UDP-GalNAc, telle qu'elle a été vue dans la seule GalNAc transférase (EXTL2 EC 2.4.1.223, tableau II, p16) cristallisée en présence de son substrat entier. Cette conformation a d'autre part pu être dockée dans un modèle réalisé au CBM pour une partie du site actif de la ppGalNAc-T1 (Duclos *et al.*, 2004) et aussi dans l'étude de la structure cristalline de la ppGalNAc-T10 (Kubota *et al.*, 2006). Elle suggère une réactivité accrue du donneur et une possibilité pour l'accepteur de s'approcher près du donneur de façon à ce que le transfert s'opère en une interaction directe selon un mécanisme de type SN1 permettant une rétention de la configuration alpha du GalNAc. Il y a donc là aussi tout un volet d'expériences à poursuivre, pour comprendre si et pourquoi les nucléotides-sucres peu ou pas ou bons donneurs peuvent prendre cette conformation.

Enfin, les résultats obtenus pour le GalNAc-1-P montrent que la partie saccharidique est capable d'interagir avec l'enzyme en présence (non montré ici) ou non du cofacteur métallique. Ce résultat n'est pas surprenant puisque l'UDP-GalNAc en absence de métal se fixe au site actif de l'enzyme principalement par la partie GalNAc. Cependant, il faut être prudent car notre enzyme possède un site lectine et le signal STD observé pour le GalNAc-1-P pourrait très bien provenir d'une interaction avec ce site spécifique de la reconnaissance des sucres.

III.4. Conclusion

L'action catalytique combinée des enzymes humaines GK2 et AGX1 permet de produire rapidement des analogues de l'UDP-GalNAc. Les modifications concernant la chaîne N-Acétyle du GalNAc n'empêchent pas la formation des UDP-sucres correspondants sauf quand le groupement introduit est trop volumineux (\geq butyryl). Pour les analogues désoxy, le composé UDP-4d-GalNAc a pu être synthétisé par cette voie enzymatique. En revanche, la présence d'un groupement hydroxyle en position 6 est requise au moins pour l'activité de GK2 et pour cette raison nous n'avons pas été en mesure de produire l'UDP-6d-GalNAc. De même, faute d'avoir pu obtenir du 3d-GalNAc, nous n'avons pas pu essayer de synthétiser le nucléotide-sucres correspondant au moyen du couple d'enzyme GK2-AGX1.

Cependant, disposant de quelques analogues d'UDP-GalNAc, des études de transfert et d'inhibition ont été réalisées *in vitro* avec la ppGalNAc-T1 bovine. Elles ont notamment permis d'attribuer un rôle différent aux hydroxyles en C-3 et C-4 de la partie GalNAc du ligand. La présence d'un hydroxyle en C-4 semble nécessaire au transfert mais pas à l'interaction enzyme-substrat alors que ce groupement en C-3 contribue fortement à la fixation du ligand dans le site actif mais n'est à priori pas requis pour le transfert. Parmi les molécules synthétisées, l'UDP-4d-GalNAc, l'UDP-GalNHCOCH₂Cl et l'UDP-GalNAz sont de bons candidats pour étudier de manière plus fine l'interaction enzyme-substrat puisque l'une d'entre elle est un bon inhibiteur de l'enzyme et les deux autres sont des substrats donneurs de qualité différente.

La technique de STD-NMR est particulièrement bien adaptée à l'étude de l'interaction entre une grosse protéine comme la ppGalNAc-T1 et un petit ligand de type UDP-sucres. Cette méthode a à plusieurs reprises été employée pour étudier des interactions entre des enzymes et leurs substrats de type nucléotides- sucres (Biet et Peters, 2001, Blume *et al.*, 2004, Lamerz *et al.*, 2006, Yuan *et al.*, 2005) ou encore des mimes glycaniques en interaction avec des lectines ou des anticorps (Johnson et Pinto, 2004). Récemment, l'équipe de Peters a montré l'analyse d'une galactosyltransférase par cette méthode (Blume *et al.*, 2006). Les résultats montrent que pour cette enzyme, la GTB, la partie uridique des ligands est bien plus ancrée au site actif que la partie saccharidique ce qui fait de l'UDP l'épitope dominant dans l'interaction. Dans cette étude, le proton H1' du ribose et le proton aromatique H5'' de tous les ligands reçoivent le maximum de transfert de saturation alors que dans notre cas, cette observation est vraie

RÉSULTATS ET DISCUSSION

principalement pour les substrats non donneurs. Pour les substrats donneurs de la ppGalNAc-T1, nos résultats montrent que la partie GalNAc interagit d'avantage avec l'enzyme particulièrement autour de la fonctionnalité NAc qui donne sa spécificité à l'enzyme et il est possible que le ribose s'en trouve éjecté du site.

CONCLUSION
ET
PERSPECTIVES

Ce travail de thèse s'inscrit dans la thématique de recherche développée par l'équipe de V. Piller et F. Piller au CBM sur la biologie cellulaire et moléculaire de la glycosylation. L'objectif de ce travail était de développer des outils chimiques et biologiques permettant la synthèse de glycoconjugués et de mimes glycaniques en quantités compatibles avec des études mécanistiques et immunologiques de la *O*-glycosylation.

Synthèse enzymatique de glycoconjugués

Pour pallier les problèmes liés à la synthèse chimique de glycoconjugués, nous avons mis au point une méthode de synthèse faisant intervenir 5 enzymes et permettant le transfert d'unités saccharidiques GalNAc sur divers accepteurs peptidiques ou oligosaccharidiques. Deux des enzymes, GK2 et AGX1, responsables de la synthèse du nucléotide sucre UDP-GalNAc et non-commercialisées, ont été produites en tant que protéines recombinantes chez *E. coli* avec un bon niveau d'expression. L'optimisation des conditions de fonctionnement du cycle enzymatique nous permet désormais d'obtenir des quantités importantes de glycoconjugués de type mucine ou d'oligosaccharides dont les applications sont nombreuses. Nous avons, pour notre part, réalisé des essais d'immunisation avec les glycopeptides de type mucine synthétisés dans le contexte d'un design de vaccin anti-cancéreux. Les résultats obtenus sont très intéressants mais nécessitent d'être confirmés par des analyses complémentaires. Le développement de ce cycle enzymatique ouvre la voie à un grand nombre de perspectives :

- utiliser le cycle pour la glycosylation de peptides en ajoutant des ppGalNAc-Ts de spécificité différente comme la ppGalNAc-T4 capable de transférer le GalNAc sur le motif PDTR de MUC1 et n'acceptant que des substrats peptidiques déjà glycosylés comme substrat accepteur.

- La transposition du cycle dans un système levure pourrait être envisagée dans le cadre du projet développé dans notre équipe par Sylvain Bourgerie et visant à humaniser la glycosylation chez la levure. L'UDP-GalNAc, naturellement absent chez les levures, est pour le moment approvisionné par l'action d'une épimérase à partir d'UDP-GlcNAc endogène. La mise en place du cycle serait une solution aux rendements faibles de bioconversion liés à cette enzyme.

Synthèse enzymatique de molécules analogues de l'UDP-GalNAc

La spécificité « large » des enzymes GK2 et AGX1 a été mise à profit pour la synthèse d'analogues de l'UDP-GalNAc. Ces analogues modifiés sur la partie saccharidique du ligand représentent de formidables outils pour l'étude du mécanisme catalytique de la ppGalNAc-T1. Des études par STD-NMR sur les interactions protéine/ligands ont d'ailleurs été entreprises en collaboration avec l'équipe de F.Vovelle (CBM, Orléans). Les tests de transfert *in vitro*, les tests d'inhibition et les expériences STD-NMR réalisés avec les différents ligands sont complémentaires et la confrontation des résultats permet d'établir que lorsqu'il y a transfert, la partie saccharidique ainsi que la partie uridique sont toutes les deux ancrées dans le site actif. L'étude par STD-NMR est la première à montrer l'interaction de la ppGalNAc-T1 avec son substrat non clivé et peut permettre de tester l'hypothèse d'une conformation coudée adoptée par le substrat avant la coupure catalytique. L'analyse par cette méthode des ligands modifiés permet de déterminer les positions les plus caractéristiques pour l'interaction mais surtout pour le transfert. Ces résultats encourageants devraient se poursuivre par l'analyse de substrats modifiés sur la partie uridique. Les analogues déjà synthétisés permettent aussi de continuer les recherches dans diverses directions :

- par exemple, l'utilisation des analogues d'UDP-GalNAc, qui se sont avérés inhibiteurs de la ppGalNAc-T1, pourrait permettre la cristallisation de l'enzyme en présence d'un substrat non clivé.

- les analogues de GalNAc, dont les UDP-sucres sont substrats donneurs de la ppGalNAc-T1, pourraient être employés pour le ciblage de cellules cancéreuses. En effet, plusieurs travaux laissent à penser que ces analogues sous une forme *O*-acétylée seraient certainement incorporés de manière préférentielle dans les cellules en division rapide comme les cellules cancéreuses. Les enzymes GK2 et AGX1 étant naturellement présentes dans les cellules humaines, ces analogues seraient convertis en UDP-sucres et acheminés jusqu'au Golgi par un transporteur spécifique d'UDP-GalNAc. Les monosaccharides modifiés seraient ensuite incorporés aux protéines lors des modifications post-traductionnelles par action catalytique des différentes ppGalNAc-Ts et se retrouveraient en surface cellulaire où ils pourraient alors servir de marqueurs cellulaires (figure 50).

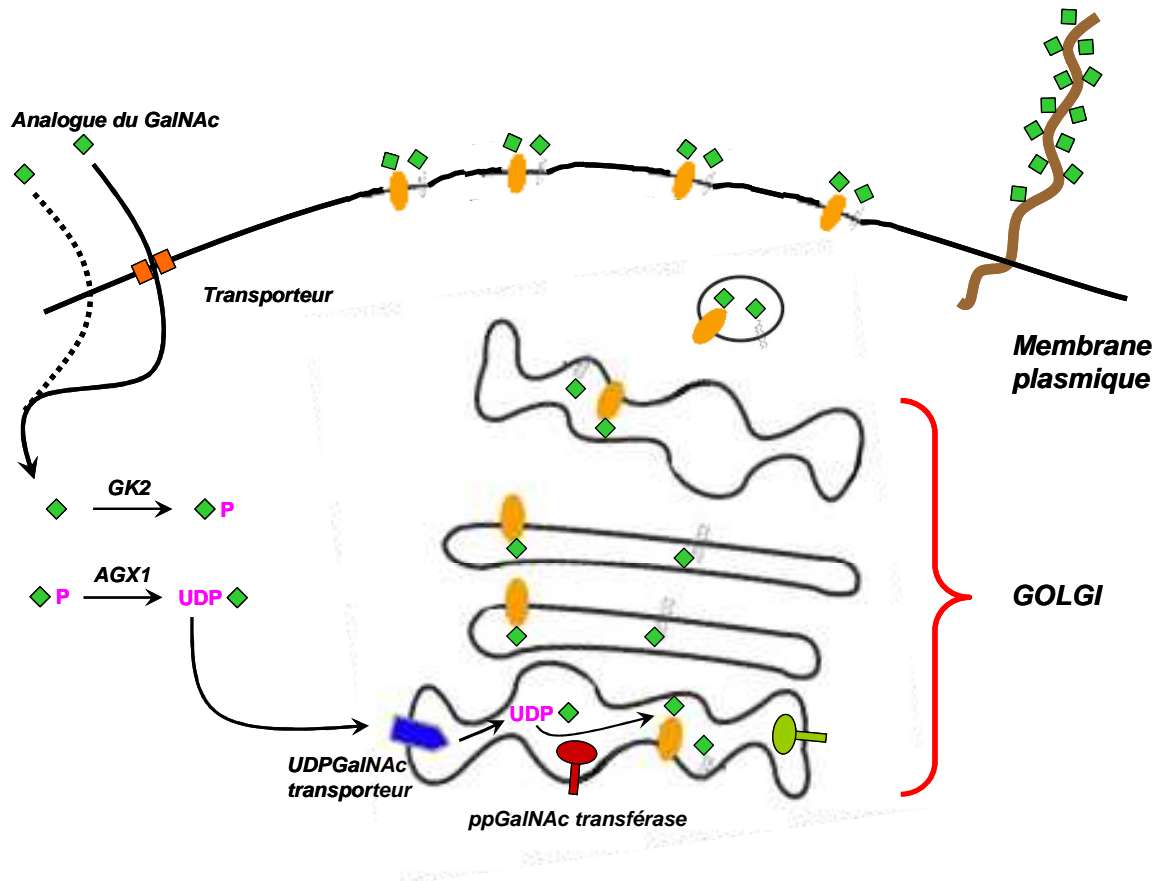


Figure 50. Schéma représentant les voies de biosynthèse que pourrait emprunter un analogue de GalNAc dans une cellule humaine où les partenaires GK2, AGX1, transporteur d'UDP-GalNAc, et ppGalNAc transférase sont naturellement présents.

BIBLIOGRAPHIE

- Acres, B. and Limacher, J. M. 2005. *Expert Rev Vaccines*. MUC1 as a target antigen for cancer immunotherapy. **4** (4): 493-502.
- Alexander, J., Sidney, J., Southwood, S., Ruppert, J., Oseroff, C., Maewal, A., Snoke, K., Serra, H. M., Kubo, R. T., Sette, A. and et al. 1994. *Immunity*. Development of high potency universal DR-restricted helper epitopes by modification of high affinity DR-blocking peptides. **1** (9): 751-61.
- Arsequell, G. and Valencia, G. 1997. *Tetrahedron-Asymmetry*. O-Glycosyl alpha-amino acids as building blocks for glycopeptide synthesis. **8** (17): 2839-2876.
- Ashwell, G. and Morell, A. 1974. *Biochem Soc Symp*. The dual role of sialic acid in the hepatic recognition and catabolism of serum glycoproteins. (40): 117-24.
- Baldus, S. E., Engelmann, K. and Hanisch, F. G. 2004. *Crit Rev Clin Lab Sci*. MUC1 and the MUCs: a family of human mucins with impact in cancer biology. **41** (2): 189-231.
- Bardor, M., Nguyen, D. H., Diaz, S. and Varki, A. 2005. *J Biol Chem*. Mechanism of uptake and incorporation of the non-human sialic acid N-glycolylneuraminic acid into human cells. **280** (6): 4228-37.
- Bennett, E. P., Hassan, H. and Clausen, H. 1996. *J Biol Chem*. cDNA cloning and expression of a novel human UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine. Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase, GalNAc-t3. **271** (29): 17006-12.
- Bennett, E. P., Hassan, H., Hollingsworth, M. A. and Clausen, H. 1999a. *FEBS Lett*. A novel human UDP-N-acetyl-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase, GalNAc-T7, with specificity for partial GalNAc-glycosylated acceptor substrates. **460** (2): 226-30.
- Bennett, E. P., Hassan, H., Mandel, U., Hollingsworth, M. A., Akisawa, N., Ikematsu, Y., Merckx, G., van Kessel, A. G., Olofsson, S. and Clausen, H. 1999b. *J Biol Chem*. Cloning and characterization of a close homologue of human UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-T3, designated GalNAc-T6. Evidence for genetic but not functional redundancy. **274** (36): 25362-70.
- Bennett, E. P., Hassan, H., Mandel, U., Mirgorodskaya, E., Roepstorff, P., Burchell, J., Taylor-Papadimitriou, J., Hollingsworth, M. A., Merckx, G., van Kessel, A. G., Eiberg, H., Steffensen, R. and Clausen, H. 1998. *J Biol Chem*. Cloning of a human UDP-N-acetyl-alpha-D-Galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase that complements other GalNAc-transferases in complete O-glycosylation of the MUC1 tandem repeat. **273** (46): 30472-81.
- Bertozzi, C. R. and Kiessling, L. L. 2001. *Science*. Chemical glycobiology. **291** (5512): 2357-64.
- Biet, T. and Peters, T. 2001. *Angewandte Chemie-International Edition*. Molecular recognition of UDP-Gal by beta-1,4-galactosyltransferase T1. **40** (22): 4189-4192.
- Blixt, O., van Die, I., Norberg, T. and van den Eijnden, D. H. 1999. *Glycobiology*. High-level expression of the Neisseria meningitidis IgtA gene in Escherichia coli and characterization of

- the encoded N-acetylglucosaminyltransferase as a useful catalyst in the synthesis of GlcNAc beta 1-->3Gal and GalNAc beta 1-->3Gal linkages. **9** (10): 1061-71.
- Blume, A., Angulo, J., Biet, T., Peters, H., Benie, A. J., Palcic, M. and Peters, T. 2006. *J Biol Chem*. Fragment based screening of the donor substrate specificity of human blood group B galactosyltransferase using STD NMR.
- Blume, A., Benie, A. J., Stolz, F., Schmidt, R. R., Reutter, W., Hinderlich, S. and Peters, T. 2004. *J Biol Chem*. Characterization of ligand binding to the bifunctional key enzyme in the sialic acid biosynthesis by NMR: I. Investigation of the UDP-GlcNAc 2-epimerase functionality. **279** (53): 55715-21.
- Brockhausen, I. 1999. *Biochim Biophys Acta*. Pathways of O-glycan biosynthesis in cancer cells. **1473** (1): 67-95.
- Bulter, T., Schumacher, T., Namdjou, D. J., Gutierrez Gallego, R., Clausen, H. and Elling, L. 2001. *Chembiochem*. Chemoenzymatic synthesis of biotinylated nucleotide sugars as substrates for glycosyltransferases. **2** (12): 884-94.
- Busca, P. and Martin, O. 2004. *Tetrahedron Letters*. Synthesis of UDP-GalNAc analogues as probes for the study of polypeptide-alpha-GalNAc-transferases. Part 2. **45**: 4433-4436.
- Busca, P., Piller, V., Piller, F. and Martin, O. R. 2003. *Bioorg Med Chem Lett*. Synthesis and biological evaluation of new UDP-GalNAc analogues for the study of polypeptide-alpha-GalNAc-transferases. **13** (11): 1853-6.
- Buskas, T., Ingale, S., and Boons, G.J. 2006. *Glycobiology*. Glycopeptides as versatile tools for glycobiology. **16** (8) : 113R-136R.
- Cadène, B. and Chait, B. T. 2000. *Anal. Chem*. A robust, detergent-friendly method for mass spectrometric analysis of integral membrane proteins. (72): 5655-5658.
- Carlson, D. M., Swanson, A. L. and Roseman, S. 1964. *Biochemistry*. Preparation of Crystalline Alpha-D-Galactosamine-1-Phosphoric Acid and Its Conversion to Udp-N-Acetylgalactosamine. **47**: 402.
- Casaravilla, C., Freire, T., Malgor, R., Medeiros, A., Osinaga, E. and Carmona, C. 2003. *J Parasitol*. Mucin-type O-glycosylation in helminth parasites from major taxonomic groups: evidence for widespread distribution of the Tn antigen (GalNAc-Ser/Thr) and identification of UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase activity. **89** (4): 709-14.
- Chen, X., Fang, J., Zhang, J., Liu, Z., Shao, J., Kowal, P., Andreana, P. and Wang, P. G. 2001. *J Am Chem Soc*. Sugar nucleotide regeneration beads (superbeads): a versatile tool for the practical synthesis of oligosaccharides. **123** (9): 2081-2082.
- Cheng, L., Tachibana, K., Iwasaki, H., Kameyama, A., Zhang, Y., Kubota, T., Hiruma, T., Kudo, T., Guo, J. M. and Narimatsu, H. 2004. *FEBS Lett*. Characterization of a novel human UDP-GalNAc transferase, pp-GalNAc-T15. **566** (1-3): 17-24.
- Cheng, L., Tachibana, K., Zhang, Y., Guo, J., Kahori Tachibana, K., Kameyama, A., Wang, H., Hiruma, T., Iwasaki, H., Togayachi, A., Kudo, T. and Narimatsu, H. 2002. *FEBS Lett*.

- Characterization of a novel human UDP-GalNAc transferase, pp-GalNAc-T10. **531** (2): 115-21.
- Chien, J. L., Williams, T. and Basu, S. 1973. *J Biol Chem*. Biosynthesis of a globoside-type glycosphingolipid by a -N-acetylgalactosaminyltransferase from embryonic chicken brain. **248** (5): 1778-85.
- Chong, S., Mersha, F. B., Comb, D. G., Scott, M. E., Landry, D., Vence, L. M., Perler, F. B., Benner, J., Kucera, R. B., Hirvonen, C. A., Pelletier, J. J., Paulus, H. and Xu, M. Q. 1997. *Gene*. Single-column purification of free recombinant proteins using a self-cleavable affinity tag derived from a protein splicing element. **192** (2): 271-81.
- Cremer, G. A., Bureaud, N., Piller, V., Kunz, H., Piller, F. and Delmas, A. F. 2006a. *ChemMedChem*. Synthesis and Biological Evaluation of a Multiantigenic Tn/TF-Containing Glycopeptide Mimic of the Tumor-Related MUC1 Glycoprotein. **1** (9): 965-968.
- Cremer, G. A., Tariq, H. and Delmas, A. F. 2006b. *J Pept Sci*. Combining a polar resin and a pseudo-proline to optimize the solid-phase synthesis of a 'difficult sequence'. **12** (6): 437-42.
- Danishefsky, S. J. and Allen, J. R. 2000. *Angew Chem Int Ed Engl*. From the Laboratory to the Clinic: A Retrospective on Fully Synthetic Carbohydrate-Based Anticancer Vaccines Frequently used abbreviations are listed in the appendix. **39** (5): 836-863.
- David, S., Auge, C. and Gautheron, C. 1991. *Adv Carbohydr Chem Biochem*. Enzymic methods in preparative carbohydrate chemistry. **49**: 175-237.
- Davies, G. J. 2001. *Nat Struct Biol*. Sweet secrets of synthesis. **8** (2): 98-100.
- de Beer, T., Vliegthart, J. F., Loffler, A. and Hofsteenge, J. 1995. *Biochemistry*. The hexopyranosyl residue that is C-glycosidically linked to the side chain of tryptophan-7 in human RNase Us is alpha-mannopyranose. **34** (37): 11785-9.
- del Guercio, M. F., Alexander, J., Kubo, R. T., Arrhenius, T., Maewal, A., Appella, E., Hoffman, S. L., Jones, T., Valmori, D., Sakaguchi, K., Grey, H. M. and Sette, A. 1997. *Vaccine*. Potent immunogenic short linear peptide constructs composed of B cell epitopes and Pan DR T helper epitopes (PADRE) for antibody responses in vivo. **15** (4): 441-8.
- Diekman, A. B. and Goldberg, E. 1994. *Biol Reprod*. Characterization of a human antigen with sera from infertile patients. **50** (5): 1087.
- Dube, D. H., Prescher, J. A., Quang, C. N. and Bertozzi, C. R. 2006. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Probing mucin-type O-linked glycosylation in living animals. **103** (13): 4819-24.
- Duclos, S., Da Silva, P., Vovelle, F., Piller, F. and Piller, V. 2004. *Protein Eng Des Sel*. Characterization of the UDP-N-acetylgalactosamine binding domain of bovine polypeptide alphaN-acetylgalactosaminyltransferase T1. **17** (8): 635-46.
- Elbein, A. D. 1987a. *Methods Enzymol*. Glycosylation inhibitors for N-linked glycoproteins. **138**: 661-709.
- Elbein, A. D. 1987b. *Annu Rev Biochem*. Inhibitors of the biosynthesis and processing of N-linked oligosaccharide chains. **56**: 497-534.

- Elhammer, A. and Kornfeld, S. 1986. *J Biol Chem*. Purification and characterization of UDP-N-acetylgalactosamine: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase from bovine colostrum and murine lymphoma BW5147 cells. **261** (12): 5249-55.
- Feng, F., Okuyama, K., Niikura, K., Ohta, T., Sadamoto, R., Monde, K., Noguchi, T. and Nishimura, S. 2004. *Org Biomol Chem*. Chemo-enzymatic synthesis of fluorinated 2-N-acetamidoglycosyl nucleotides using UDP-GlcNAc pyrophosphorylase. **2** (11): 1617-23.
- Frechet, J. M. and Schuerch, C. 1971. *J Amer Chem Soc*. Solid-phase synthesis of oligosaccharides. I. Preparation of the solid support. Poly[p-(1-propen-3-ol-1-yl)styrene]. **93**: 492-496.
- Freeze, H. H. 2006. *Nat Rev Genet*. Genetic defects in the human glycome. **7** (7): 537-51.
- Fritz, T. A., Hurley, J. H., Trinh, L. B., Shiloach, J. and Tabak, L. A. 2004. *Proc Natl Acad Sci U S A*. The beginnings of mucin biosynthesis: the crystal structure of UDP-GalNAc:polypeptide alpha-N-acetylgalactosaminyltransferase-T1. **101** (43): 15307-12.
- Fritz, T. A., Raman, J. and Tabak, L. A. 2006. *J Biol Chem*. Dynamic association between the catalytic and lectin domains of human UDP-GalNAc:polypeptide alpha-N-acetylgalactosaminyltransferase-2. **281** (13): 8613-9.
- Gendler, S. J., Lancaster, C. A., Taylor-Papadimitriou, J., Duhig, T., Peat, N., Burchell, J., Pemberton, L., Lalani, E. N. and Wilson, D. 1990. *J Biol Chem*. Molecular cloning and expression of human tumor-associated polymorphic epithelial mucin. **265** (25): 15286-93.
- Gerken, T. A., Raman, J., Fritz, T. A. and Jamison, O. 2006. *J Biol Chem*. Identification of common and unique peptide substrate preferences for the UDP-GalNAc: polypeptide alpha - N-acetylgalactosaminyltransferases T1 & T2 (ppGalNAc T1 & T2) derived from oriented random peptide substrates.
- Gerken, T. A., Tep, C. and Rarick, J. 2004. *Biochemistry*. Role of peptide sequence and neighboring residue glycosylation on the substrate specificity of the uridine 5'-diphosphate-alpha-N-acetylgalactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyl transferases T1 and T2: kinetic modeling of the porcine and canine submaxillary gland mucin tandem repeats. **43** (30): 9888-900.
- Ghosh, P., Dahms, N. M. and Kornfeld, S. 2003. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale. **4** (3): 202-12.
- Goletz, S., Thiede, B., Hanisch, F. G., Schultz, M., Peter-Katalinic, J., Muller, S., Seitz, O. and Karsten, U. 1997. *Glycobiology*. A sequencing strategy for the localization of O-glycosylation sites of MUC1 tandem repeats by PSD-MALDI mass spectrometry. **7** (7): 881-96.
- Gornik, O., Domic, J., Flogel, M. and Lauc, G. 2006. *Acta Pharm*. Glycoscience -- a new frontier in rational drug design. **56** (1): 19-30.
- Gotoh, M., Sato, T., Kiyohara, K., Kameyama, A., Kikuchi, N., Kwon, Y. D., Ishizuka, Y., Iwai, T., Nakanishi, H. and Narimatsu, H. 2004. *FEBS Lett*. Molecular cloning and

- characterization of beta1,4-N-acetylgalactosaminyltransferases IV synthesizing N,N'-diacetyllactosamine. **562** (1-3): 134-40.
- Goupy, J. 1988. La méthode des plans d'expérience. Dunod
- Grogan, M. J., Pratt, M. R., Marcaurelle, L. A. and Bertozzi, C. R. 2002. *Annu Rev Biochem.* Homogeneous glycopeptides and glycoproteins for biological investigation. **71**: 593-634.
- Guo, J. M., Zhang, Y., Cheng, L., Iwasaki, H., Wang, H., Kubota, T., Tachibana, K. and Narimatsu, H. 2002. *FEBS Lett.* Molecular cloning and characterization of a novel member of the UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase family, pp-GalNAc-T12. **524** (1-3): 211-8.
- Guo, Z. and Shao, N. 2005. *Med Res Rev.* Glycopeptide and glycoprotein synthesis involving unprotected carbohydrate building blocks. **25** (6): 655-78.
- Hagen, F. K., Ten Hagen, K. G., Beres, T. M., Balys, M. M., VanWuyckhuysse, B. C. and Tabak, L. A. 1997. *J Biol Chem.* cDNA cloning and expression of a novel UDP-N-acetyl-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase. **272** (21): 13843-8.
- Hagopian, A. and Eylar, E. H. 1969. *Arch Biochem Biophys.* Glycoprotein biosynthesis: the purification and characterization of a polypeptide. N-acetylgalactosaminyl transferase from bovine submaxillary glands. **129** (2): 515-24.
- Hang, H. C., Yu, C., Kato, D. L. and Bertozzi, C. R. 2003. *Proc Natl Acad Sci U S A.* A metabolic labeling approach toward proteomic analysis of mucin-type O-linked glycosylation. **100** (25): 14846-51.
- Hang, H. C., Yu, C., Pratt, M. R. and Bertozzi, C. R. 2004a. *J Am Chem Soc.* Probing glycosyltransferase activities with the Staudinger ligation. **126** (1): 6-7.
- Hang, H. C., Yu, C., Ten Hagen, K. G., Tian, E., Winans, K. A., Tabak, L. A. and Bertozzi, C. R. 2004b. *Chem Biol.* Small molecule inhibitors of mucin-type O-linked glycosylation from a uridine-based library. **11** (3): 337-45.
- Hanisch, F. G. 2001. *Biol Chem.* O-glycosylation of the mucin type. **382** (2): 143-9.
- Hanisch, F. G., Muller, S., Hassan, H., Clausen, H., Zachara, N., Gooley, A. A., Paulsen, H., Alving, K. and Peter-Katalinic, J. 1999. *J Biol Chem.* Dynamic epigenetic regulation of initial O-glycosylation by UDP-N-Acetylgalactosamine:Peptide N-acetylgalactosaminyltransferases. site-specific glycosylation of MUC1 repeat peptide influences the substrate qualities at adjacent or distant Ser/Thr positions. **274** (15): 9946-54.
- Hanisch, F. G. and Ninkovic, T. 2006. *Curr Protein Pept Sci.* Immunology of O-glycosylated proteins: approaches to the design of a MUC1 glycopeptide-based tumor vaccine. **7** (4): 307-15.
- Hanisch, F. G., Schwientek, T., Von Bergwelt-Baildon, M. S., Schultze, J. L. and Finn, O. 2003. *Eur J Immunol.* O-Linked glycans control glycoprotein processing by antigen-presenting cells: a biochemical approach to the molecular aspects of MUC1 processing by dendritic cells. **33** (12): 3242-54.

- Hanisch, F. G., Stadie, T. R., Deutzmann, F. and Peter-Katalinic, J. 1996. *Eur J Biochem.* MUC1 glycoforms in breast cancer--cell line T47D as a model for carcinoma-associated alterations of O-glycosylation. **236** (1): 318-27.
- Hanson, S., Best, M., Bryan, M. C. and Wong, C. H. 2004. *Trends Biochem Sci.* Chemoenzymatic synthesis of oligosaccharides and glycoproteins. **29** (12): 656-63.
- Hasegawa, M. 1993. *Biochim Biophys Acta.* A thermodynamic model for denaturation of granulocyte colony-stimulating factor: O-linked sugar chain suppresses not the triggering deprotonation but the succeeding denaturation. **1203** (2): 295-7.
- Hashimoto, Y., Sekine, M., Iwasaki, K. and Suzuki, A. 1993. *J Biol Chem.* Purification and characterization of UDP-N-acetylgalactosamine GM3/GD3 N-acetylgalactosaminyltransferase from mouse liver. **268** (34): 25857-64.
- Hearn, V. M., Smith, Z. G. and Watkins, W. M. 1968. *Biochem J.* An a-N-acetyl-D-galactosaminyltransferase associated with the human blood-group A character. **109** (2): 315-7.
- Heidlas, J., Lees, J. W. and Whitesides, G. M. 1992. *J. Org. Chem.* Practical Enzyme-Based Syntheses of Uridine 5'-Diphosphogalactose and Uridine 5'-Diphospho-N-acetylgalactosamine on a Gram Scale. **57**: 152.
- Helenius, A. and Aebi, M. 2004. *Annu Rev Biochem.* Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. **73**: 1019-49.
- Herzner, H., Reipen, T., Schultz, M. and Kunz, H. 2000. *Chem Rev.* Synthesis of glycopeptides containing carbohydrate and Peptide recognition motifs. **100** (12): 4495-538.
- Hilkens, J., Ligtenberg, M. J., Vos, H. L. and Litvinov, S. V. 1992. *Trends Biochem Sci.* Cell membrane-associated mucins and their adhesion-modulating property. **17** (9): 359-63.
- Hill, H. D., Jr., Schwyzer, M., Steinman, H. M. and Hill, R. L. 1977. *J Biol Chem.* Ovine submaxillary mucin. Primary structure and peptide substrates of UDP-N-acetylgalactosamine:mucin transferase. **252** (11): 3799-804.
- Hochuli, E., Dobeli, H. and Schacher, A. 1987. *J Chromatogr.* New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. **411**: 177-84.
- Homa, F. L., Hollander, T., Lehman, D. J., Thomsen, D. R. and Elhammer, A. P. 1993. *J Biol Chem.* Isolation and expression of a cDNA clone encoding a bovine UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase. **268** (17): 12609-16.
- Hooper, L. V. and Gordon, J. I. 2001. *Glycobiology.* Glycans as legislators of host-microbial interactions: spanning the spectrum from symbiosis to pathogenicity. **11** (2): 1R-10R.
- Hounsell, E. F., Davies, M. J. and Renouf, D. V. 1996. *Glycoconj J.* O-linked protein glycosylation structure and function. **13** (1): 19-26.
- Imberty, A., Piller, V., Piller, F. and Breton, C. 1997. *Protein Eng.* Fold recognition and molecular modeling of a lectin-like domain in UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases. **10** (12): 1353-6.

- Ivannikova, T., Bintein, F., Malleron, A., Juliant, S., Cerutti, M., Harduin-Lepers, A., Delannoy, P., Auge, C. and Lubineau, A. 2003. *Carbohydr Res.* Recombinant (2-->3)-alpha-sialyltransferase immobilized on nickel-agarose for preparative synthesis of sialyl Lewis(x) and Lewis(a) precursor oligosaccharides. **338** (11): 1153-61.
- Jayalakshmi, V., Biet, T., Peters, T. and Krishna, N. R. 2004. *J Am Chem Soc.* Refinement of the conformation of UDP-galactose bound to galactosyltransferase using the STD NMR intensity-restrained CORCEMA optimization. **126** (28): 8610-1.
- Johnson, M. A. and Pinto, B. M. 2004. *Bioorg Med Chem.* Saturation-transfer difference NMR studies for the epitope mapping of a carbohydrate-mimetic peptide recognized by an anti-carbohydrate antibody. **12** (1): 295-300.
- Kanemitsu, T. and Kanie, O. 2002. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening.* Recent developments oligosaccharide synthesis: Tactics, solid-phase synthesis and library synthesis. **5** (5): 339-360.
- Kapitonov, D. and Yu, R. K. 1999. *Glycobiology.* Conserved domains of glycosyltransferases. **9** (10): 961-78.
- Karas, M. and Hillenkamp, F. 1988. *Anal Chem.* Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. **60** (20): 2299-301.
- Karsten, U., Diotel, C., Klich, G., Paulsen, H., Goletz, S., Muller, S. and Hanisch, F. G. 1998. *Cancer Res.* Enhanced binding of antibodies to the DTR motif of MUC1 tandem repeat peptide is mediated by site-specific glycosylation. **58** (12): 2541-9.
- Karsten, U., Serttas, N., Paulsen, H., Danielczyk, A. and Goletz, S. 2004. *Glycobiology.* Binding patterns of DTR-specific antibodies reveal a glycosylation-conditioned tumor-specific epitope of the epithelial mucin (MUC1). **14** (8): 681-92.
- Kijimoto, S., Ishibashi, T. and Makita, A. 1974. *Biochem Biophys Res Commun.* Biosynthesis of Forssman hapten from globoside by alpha-N-acetylgalactosaminyltransferase of guinea pig tissues. **56** (1): 177-84.
- Kitagawa, H., Kano, Y., Shimakawa, H., Goto, F., Ogawa, T., Okabe, H. and Sugahara, K. 1999. *Glycobiology.* Identification and characterization of a novel UDP-GalNAc:GlcAbeta-R alpha1,4-N-acetylgalactosaminyltransferase from a human sarcoma cell line. **9** (7): 697-703.
- Kitagawa, H., Tsuchida, K., Ujikawa, M. and Sugahara, K. 1995. *J Biochem (Tokyo).* Detection and characterization of UDP-GalNAc: chondroitin N-acetylgalactosaminyltransferase in bovine serum using a simple assay method. **117** (5): 1083-7.
- Ko, K. S., Zea, C. J. and Pohl, N. L. 2005. *J Org Chem.* Strategies for the chemoenzymatic synthesis of deoxysugar nucleotides: substrate binding versus catalysis. **70** (5): 1919-21.
- Kobata, A. 1979. *Anal Biochem.* Use of endo- and exoglycosidases for structural studies of glycoconjugates. **100** (1): 1-14.

- Kobata, A., Grollman, E. F. and Ginsburg, V. 1968. *Biochem Biophys Res Commun.* An enzymatic basis for blood type B in humans. **32** (2): 272-7.
- Kornfeld, S. 1992. *Annu Rev Biochem.* Structure and function of the mannose 6-phosphate/insulinlike growth factor II receptors. **61**: 307-30.
- Kozarsky, K., Kingsley, D. and Krieger, M. 1988. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Use of a mutant cell line to study the kinetics and function of O-linked glycosylation of low density lipoprotein receptors. **85** (12): 4335-9.
- Kubota, T., Shiba, T., Sugioka, S., Furukawa, S., Sawaki, H., Kato, R., Wakatsuki, S. and Narimatsu, H. 2006. *J Mol Biol.* Structural Basis of Carbohydrate Transfer Activity by Human UDP-GalNAc: Polypeptide alpha-N-Acetylgalactosaminyltransferase (pp-GalNAc-T10). **359** (3): 708-27.
- Kunz, H. and Unversagt, C. 1988. *angew. Chem.* Protecting-group-Dependent Stability of Intersaccharide Bonds - Synthesis of a Fucosyl-Chitobiose Glycopeptide. **27**: 1697.
- Laemmli, U. K. 1970. *Nature.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **227** (5259): 680-5.
- Lamerz, A. C., Haselhorst, T., Bergfeld, A. K., von Itzstein, M. and Gerardy-Schahn, R. 2006. *J Biol Chem.* Molecular cloning of the *Leishmania major* UDP-glucose pyrophosphorylase, functional characterization, and ligand binding analyses using NMR spectroscopy. **281** (24): 16314-22.
- Lan, M. S., Batra, S. K., Qi, W. N., Metzgar, R. S. and Hollingsworth, M. A. 1990. *J Biol Chem.* Cloning and sequencing of a human pancreatic tumor mucin cDNA. **265** (25): 15294-9.
- Lazarevic, D. and Thiem, J. 2002. *Carbohydr Res.* Syntheses of unnatural N-substituted UDP-galactosamines as alternative substrates for N-acetylgalactosaminyl transferases. **337** (21-23): 2187-94.
- Lemieux, R. U. and Ratcliffe, R. M. 1979. *Can. J. Chem.* The azidonitration of tri-O-acetyl-D-galactal. **57**: 1244.
- Ligtenberg, M. J., Vos, H. L., Gennissen, A. M. and Hilkens, J. 1990. *J Biol Chem.* Episialin, a carcinoma-associated mucin, is generated by a polymorphic gene encoding splice variants with alternative amino termini. **265** (10): 5573-8.
- Lis, H. and Sharon, N. 1993. *Eur J Biochem.* Protein glycosylation. Structural and functional aspects. **218** (1): 1-27.
- Liu, L., Bennett, C. S. and Wong, C. H. 2006a. *Chem Commun (Camb).* Advances in glycoprotein synthesis. (1): 21-33.
- Liu, L., Hong, Z. Y. and Wong, C. H. 2006b. *Chembiochem.* Convergent glycopeptide synthesis by traceless Staudinger ligation and enzymatic coupling. **7** (3): 429-32.
- Liu, M., Barany, G. and Live, D. 2005a. *Carbohydr Res.* Parallel solid-phase synthesis of mucin-like glycopeptides. **340** (13): 2111-22.

- Liu, M., Young, V. G., Jr., Lohani, S., Live, D. and Barany, G. 2005b. *Carbohydr Res.* Syntheses of T(N) building blocks Nalpha-(9-fluorenylmethoxycarbonyl)-O-(3,4,6-tri-O-acetyl-2-azido-2-deoxy- alpha-D-galactopyranosyl)-L-serine/L-threonine pentafluorophenyl esters: comparison of protocols and elucidation of side reactions. **340** (7): 1273-85.
- Liu, Z., Zhang, J., Chen, X. and Wang, P. G. 2002. *Chembiochem.* Combined biosynthetic pathway for de novo production of UDP-galactose: catalysis with multiple enzymes immobilized on agarose beads. **3** (4): 348-55.
- Livingston, P. O., Ragupathi, G. and Musselli, C. 2000. *J Clin Immunol.* Autoimmune and antitumor consequences of antibodies against antigens shared by normal and malignant tissues. **20** (2): 85-93.
- Lowe, J. B. 2003. *Curr Opin Cell Biol.* Glycan-dependent leukocyte adhesion and recruitment in inflammation. **15** (5): 531-8.
- Luzhetskyy, A. and Bechthold, A. 2005. *Mol Microbiol.* It works: combinatorial biosynthesis for generating novel glycosylated compounds. **58** (1): 3-5.
- Ly, H. D., Loughheed, B., Wakarchuk, W. W. and Withers, S. G. 2002. *Biochemistry.* Mechanistic studies of a retaining alpha-galactosyltransferase from *Neisseria meningitidis*. **41** (16): 5075-85.
- MacLean, G. D., Reddish, M. A., Koganty, R. R. and Longenecker, B. M. 1996. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol.* Antibodies against mucin-associated sialyl-Tn epitopes correlate with survival of metastatic adenocarcinoma patients undergoing active specific immunotherapy with synthetic STn vaccine. **19** (1): 59-68.
- Maeder, T. 2002. *Sci Am.* Sweet medicines. **287** (1): 40-7.
- Marcus, S. L., Polakowski, R., Seto, N. O., Leinala, E., Borisova, S., Blancher, A., Roubinet, F., Evans, S. V. and Palcic, M. M. 2003. *J Biol Chem.* A single point mutation reverses the donor specificity of human blood group B-synthesizing galactosyltransferase. **278** (14): 12403-5.
- Marshall, R. D. 1974. *Biochem Soc Symp.* The nature and metabolism of the carbohydrate-peptide linkages of glycoproteins. (40): 17-26.
- Matsushita, T., Hinou, H., Fumoto, M., Kurogochi, M., Fujitani, N., Shimizu, H. and Nishimura, S. 2006. *J Org Chem.* Construction of highly glycosylated mucin-type glycopeptides based on microwave-assisted solid-phase syntheses and enzymatic modifications. **71** (8): 3051-63.
- Merrifield, R. B. 1963. *J. Am. Chem. Soc.* Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. **85**: 2149-2154.
- Meyer, B. and Peters, T. 2003. *Angew Chem Int Ed Engl.* NMR spectroscopy techniques for screening and identifying ligand binding to protein receptors. **42** (8): 864-90.

- Miller, D. J., Macek, M. B. and Shur, B. D. 1992. *Nature*. Complementarity between sperm surface beta-1,4-galactosyltransferase and egg-coat ZP3 mediates sperm-egg binding. **357** (6379): 589-93.
- Mio, T., Yabe, T., Arisawa, M. and Yamada-Okabe, H. 1998. *J Biol Chem*. The eukaryotic UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylases. Gene cloning, protein expression, and catalytic mechanism. **273** (23): 14392.
- Mitra, N., Sinha, S., Ramya, T. N. and Surolia, A. 2006. *Trends Biochem Sci*. N-linked oligosaccharides as outfitters for glycoprotein folding, form and function. **31** (3): 156-63.
- Moffat, J. G. and Khorana, H. G. 1958. *J. Amer. Chem. Soc.* Nucleoside polyphosphates. VIII. New and improved syntheses of UDPG and FAD using nucleoside-5 phosphoramidates. **80**: 3756.
- Moscona, A. 2005. *N Engl J Med*. Neuraminidase inhibitors for influenza. **353** (13): 1363-73.
- Murata, T. and Usui, T. 2006. *Biosci Biotechnol Biochem*. Enzymatic synthesis of oligosaccharides and neoglycoconjugates. **70** (5): 1049-59.
- Nahalka, J., Liu, Z., Chen, X. and Wang, P. G. 2003. *Chemistry*. Superbeads: immobilization in "sweet" chemistry. **9** (2): 372-7.
- Nahalka, J., Wu, B., Shao, J., Gemeiner, P. and Wang, P. G. 2004. *Biotechnol Appl Biochem*. Production of cytidine 5'-monophospho-N-acetyl-beta-D-neuraminic acid (CMP-sialic acid) using enzymes or whole cells entrapped in calcium pectate-silica-gel beads. **40** (Pt 1): 101-6.
- Neubacher, B., Scheid, S., Kelm, S., Frasch, A. C., Meyer, B. and Thiem, J. 2006. *Chembiochem*. Synthesis of Neu5Ac Oligosaccharides and Analogues by Transglycosylation and their Binding Properties as Ligands to MAG. **7** (6): 896-899.
- Nguyen, D. H., Tangvoranuntakul, P. and Varki, A. 2005. *J Immunol*. Effects of natural human antibodies against a nonhuman sialic acid that metabolically incorporates into activated and malignant immune cells. **175** (1): 228-36.
- Ninomiya, T., Sugiura, N., Tawada, A., Sugimoto, K., Watanabe, H. and Kimata, K. 2002. *J Biol Chem*. Molecular cloning and characterization of chondroitin polymerase from *Escherichia coli* strain K4. **277** (24): 21567-75.
- O'Connell, B. C. and Tabak, L. A. 1993. *J Dent Res*. A comparison of serine and threonine O-glycosylation by UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase. **72** (12): 1554-8.
- Oh-eda, M., Hasegawa, M., Hattori, K., Kuboniwa, H., Kojima, T., Orita, T., Tomonou, K., Yamazaki, T. and Ochi, N. 1990. *J Biol Chem*. O-linked sugar chain of human granulocyte colony-stimulating factor protects it against polymerization and denaturation allowing it to retain its biological activity. **265** (20): 11432-5.
- Ohtsubo, K. and Marth, J. D. 2006. *Cell*. Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. **126** (5): 855-67.

- Okajima, T., Nakamura, Y., Uchikawa, M., Haslam, D. B., Numata, S. I., Furukawa, K. and Urano, T. 2000. *J Biol Chem*. Expression cloning of human globoside synthase cDNAs. Identification of beta 3Gal-T3 as UDP-N-acetylgalactosamine:globotriaosylceramide beta 1,3-N-acetylgalactosaminyltransferase. **275** (51): 40498-503.
- Pastuszak, I., Drake, R. and Elbein, A. D. 1996a. *J Biol Chem*. Kidney N-acetylgalactosamine (GalNAc)-1-phosphate kinase, a new pathway of GalNAc activation. **271** (34): 20776-82.
- Pastuszak, I., O'Donnell, J. and Elbein, A. D. 1996b. *J Biol Chem*. Identification of the GalNAc kinase amino acid sequence. **271** (39): 23653-6.
- Paulsen, H., Peters, S., Bielfeldt, T., Meldal, M. and Bock, K. 1995. *Carbohydr Res*. Synthesis of the glycosyl amino acids N alpha-Fmoc-Ser[Ac4-beta-D-Galp-(1-->3)-Ac2-alpha-D-GalN3p]-OPfp and N alpha-Fmoc-Thr[Ac4-beta-D-Galp-(1-->3)-Ac2-alpha-D-GalN3p]-OPfp and the application in the solid-phase peptide synthesis of multiply glycosylated mucin peptides with Tn and T antigenic structures. **268** (1): 17-34.
- Peneff, C., Ferrari, P., Charrier, V., Taburet, Y., Monnier, C., Zamboni, V., Winter, J., Harnois, M., Fassy, F. and Bourne, Y. 2001. *Embo J*. Crystal structures of two human pyrophosphorylase isoforms in complexes with UDPGlc(Gal)NAc: role of the alternatively spliced insert in the enzyme oligomeric assembly and active site architecture. **20** (22): 6191.
- Peri, F. and Nicotra, F. 2004. *Chem Commun (Camb)*. Chemoselective ligation in glycochemistry. (6): 623-7.
- Peter-Katalinic, J. 2005. *Methods Enzymol*. Methods in enzymology: O-glycosylation of proteins. **405**: 139-71.
- Piller, F., Eckhardt, A. E. and Hill, R. L. 1982. *Anal Biochem*. The preparation of UDP-N-acetylgalactosamine from UDP-N-acetylglucosamine employing UDP-N-acetylglucosamine-4-epimerase. **127** (1): 171.
- Piller, F., Hanlon, M. H. and Hill, R. L. 1983. *J Biol Chem*. Co-purification and characterization of UDP-glucose 4-epimerase and UDP-N-acetylglucosamine 4-epimerase from porcine submaxillary glands. **258** (17): 10774-8.
- Potter, B. A., Hughey, R. P. and Weisz, O. A. 2006. *Am J Physiol Cell Physiol*. Role of N- and O-glycans in polarized biosynthetic sorting. **290** (1): C1-C10.
- Pratt, M. R., Hang, H. C., Ten Hagen, K. G., Rarick, J., Gerken, T. A., Tabak, L. A. and Bertozzi, C. R. 2004. *Chem Biol*. Deconvoluting the functions of polypeptide N-alpha-acetylgalactosaminyltransferase family members by glycopeptide substrate profiling. **11** (7): 1009-16.
- Rich, J. R., Szpacenko, A., Palcic, M. and Bundle, D. R. 2004. *Angewandte Chemie*. Glycosyltransferase-Catalyzed Synthesis of Thiooligosaccharides. **116** (5): 623-625.
- Roseman, S., Distler, J. J., Moffatt, J. G. and Khorana, H. G. 1961. *J. Am. Chem. Soc.* Nucleoside Polyphosphates. XI.1 An Improved General Method for the Synthesis of Nucleotide Coenzymes. Syntheses of Uridine-5', Cytidine-5' and Guanosine-5' Diphosphate Derivatives. **83** (3): 659-663.

- Rusnati, M., Urbinati, C., Tanghetti, E., Dell'Era, P., Lortat-Jacob, H. and Presta, M. 2002. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Cell membrane GM1 ganglioside is a functional coreceptor for fibroblast growth factor 2. **99** (7): 4367-72.
- Sames, D., Chen, X. T. and Danishefsky, S. J. 1997. *Nature*. Convergent total synthesis of a tumour-associated mucin motif. **389** (6651): 587-91.
- Sampathkumar, S. G., Li, A. V., Jones, M. B., Sun, Z. and Yarema, K. J. 2006. *Nat Chem Biol*. Metabolic installation of thiols into sialic acid modulates adhesion and stem cell biology. **2** (3): 149-52.
- Sato, T., Gotoh, M., Kiyohara, K., Kameyama, A., Kubota, T., Kikuchi, N., Ishizuka, Y., Iwasaki, H., Togayachi, A., Kudo, T., Ohkura, T., Nakanishi, H. and Narimatsu, H. 2003. *J Biol Chem*. Molecular cloning and characterization of a novel human beta 1,4-N-acetylgalactosaminyltransferase, beta 4GalNAc-T3, responsible for the synthesis of N,N'-diacetylactosediamine, galNAc beta 1-4GlcNAc. **278** (48): 47534-44.
- Saxon, E. and Bertozzi, C. R. 2000. *Science*. Cell surface engineering by a modified Staudinger reaction. **287** (5460): 2007-10.
- Schäfer, A. and Thiem, J. 2000. *J. Org. chem*. Synthesis of Novel Donor Mimetics of UDP-Gal, UDP-GlcNAc, and UDP-GalNAc as Potential Transferase Inhibitors. **65**: 24-29.
- Schuette, C. G., Doering, T., Kolter, T. and Sandhoff, K. 1999. *Biol Chem*. The glycosphingolipidoses-from disease to basic principles of metabolism. **380** (7-8): 759-66.
- Schweizer, A., Clausen, H., van Meer, G. and Hauri, H. P. 1994. *J Biol Chem*. Localization of O-glycan initiation, sphingomyelin synthesis, and glucosylceramide synthesis in Vero cells with respect to the endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment. **269** (6): 4035-41.
- Schwientek, T., Bennett, E. P., Flores, C., Thacker, J., Hollmann, M., Reis, C. A., Behrens, J., Mandel, U., Keck, B., Schafer, M. A., Haselmann, K., Zubarev, R., Roepstorff, P., Burchell, J. M., Taylor-Papadimitriou, J., Hollingsworth, M. A. and Clausen, H. 2002. *J Biol Chem*. Functional conservation of subfamilies of putative UDP-N-acetylgalactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases in *Drosophila*, *Caenorhabditis elegans*, and mammals. One subfamily composed of I(2)35Aa is essential in *Drosophila*. **277** (25): 22623-38.
- Seeberger, P. H. and Werz, D. B. 2005. *Nat Rev Drug Discov*. Automated synthesis of oligosaccharides as a basis for drug discovery. **4** (9): 751-63.
- Seitz, O. 2000. *ChemBiochem*. Glycopeptide synthesis and the effects of glycosylation on protein structure and activity. **1** (4): 214-46.
- Senn, H. J., Cooper, C., Warnke, P. C., Wagner, M. and Decker, K. 1981. *Eur J Biochem*. Ganglioside biosynthesis in rat liver. Characterization of UDP-N-acetylgalactosamine -- GM3 acetylgalactosaminyltransferase. **120** (1): 59-67.
- Seto, N. O., Palcic, M. M., Compston, C. A., Li, H., Bundle, D. R. and Narang, S. A. 1997. *J Biol Chem*. Sequential interchange of four amino acids from blood group B to blood group A glycosyltransferase boosts catalytic activity and progressively modifies substrate recognition in human recombinant enzymes. **272** (22): 14133-8.

- Shao, J., Hayashi, T. and Wang, P. G. 2003. *Appl Environ Microbiol.* Enhanced production of alpha-galactosyl epitopes by metabolically engineered *Pichia pastoris*. **69** (9): 5238-42.
- Shao, J., Zhang, J., Kowal, P. and Wang, P. G. 2002. *Appl Environ Microbiol.* Donor substrate regeneration for efficient synthesis of globotetraose and isoglobotetraose. **68** (11): 5634-40.
- Shimizu, M. and Yamauchi, K. 1982. *J Biochem (Tokyo)*. Isolation and characterization of mucin-like glycoprotein in human milk fat globule membrane. **91** (2): 515-24.
- Shriver, Z., Raguram, S. and Sasisekharan, R. 2004. *Nat Rev Drug Discov.* Glycomics: a pathway to a class of new and improved therapeutics. **3** (10): 863-73.
- Simpson, M. A., Cross, H., Proukakis, C., Priestman, D. A., Neville, D. C., Reinkensmeier, G., Wang, H., Wiznitzer, M., Gurtz, K., Verganelaki, A., Pryde, A., Patton, M. A., Dwek, R. A., Butters, T. D., Platt, F. M. and Crosby, A. H. 2004. *Nat Genet.* Infantile-onset symptomatic epilepsy syndrome caused by a homozygous loss-of-function mutation of GM3 synthase. **36** (11): 1225-9.
- Sjolin, P., Elofsson, M. and Kihlberg, J. 1996. *J Org Chem.* Removal of Acyl Protective Groups from Glycopeptides: Base Does Not Epimerize Peptide Stereocenters, and beta-Elimination Is Slow. **61** (2): 560-565.
- Song, J., Zhang, H. C., Li, L., Bi, Z. S., Chen, M., Wang, W., Yao, Q. J., Guo, H. J., Tian, M., Li, H. F., Yi, W. and Wang, P. G. 2006. *Current Organic Synthesis.* Enzymatic biosynthesis of oligosaccharides and glycoconjugates. **3** (2): 159-168.
- Sorensen, A. L., Reis, C. A., Tarp, M. A., Mandel, U., Ramachandran, K., Sankaranarayanan, V., Schwientek, T., Graham, R., Taylor-Papadimitriou, J., Hollingsworth, M. A., Burchell, J. and Clausen, H. 2006. *Glycobiology.* Chemoenzymatically synthesized multimeric Tn/STn MUC1 glycopeptides elicit cancer-specific anti-MUC1 antibody responses and override tolerance. **16** (2): 96-107.
- Springer, G. F. 1984. *Science.* T and Tn, general carcinoma autoantigens. **224** (4654): 1198-206.
- Stepensky, D., Tzehoval, E., Vadai, E. and Eisenbach, L. 2006. *Clin Exp Immunol.* O-glycosylated versus non-glycosylated MUC1-derived peptides as potential targets for cytotoxic immunotherapy of carcinoma. **143** (1): 139-49.
- Strecker, G., Wieruszkeski, J. M., Fontaine, M. D. and Plancke, Y. 1994. *Glycobiology.* Structure of the major neutral oligosaccharide-alditols released from the egg jelly coats of *Axolotl maculatum*. Characterization of the carbohydrate sequence GalNAc(beta 1-4)[Fuc(alpha 1-3)] GlcNAc(beta 1-3/6). **4** (5): 605-9.
- Strecker, G., Wieruszkeski, J. M., Michalski, J. C. and Montreuil, J. 1992. *Biochem J.* ¹H- and ¹³C-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. **287** (Pt 3): 905-9.

- Strecker, G., Wieruszkeski, J. M., Plancke, Y. and Boilly, B. 1995. *Glycobiology*. Primary structure of 12 neutral oligosaccharide-alditols released from the jelly coats of the anuran *Xenopus laevis* by reductive beta-elimination. **5** (1): 137-46.
- Stwora-Wojczyk, M. M., Kissinger, J. C., Spitalnik, S. L. and Wojczyk, B. S. 2004. *Int J Parasitol*. O-glycosylation in *Toxoplasma gondii*: identification and analysis of a family of UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases. **34** (3): 309-22.
- Sugiura, M., Kawasaki, T. and Yamashina, I. 1982. *J Biol Chem*. Purification and characterization of UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosamine transferase from an ascites hepatoma, AH 66. **257** (16): 9501-7.
- Sullivan, N. J., Peterson, M., Yang, Z. Y., Kong, W. P., Duckers, H., Nabel, E. and Nabel, G. J. 2005. *J Virol*. Ebola virus glycoprotein toxicity is mediated by a dynamin-dependent protein-trafficking pathway. **79** (1): 547-53.
- Syrigos, K. N., Karayiannakis, A. J. and Zbar, A. 1999. *Anticancer Res*. Mucins as immunogenic targets in cancer. **19** (6B): 5239-44.
- Szumilo, T., Zeng, Y., Pastuszak, I., Drake, R., Szumilo, H. and Elbein, A. D. 1996. *J Biol Chem*. Purification to homogeneity and properties of UDP-GlcNAc (GalNAc) pyrophosphorylase. **271** (22): 13147-54.
- Takahashi, H. K., Metoki, R. and Hakomori, S. 1988. *Cancer Res*. Immunoglobulin G3 monoclonal antibody directed to Tn antigen (tumor-associated alpha-N-acetylgalactosaminyl epitope) that does not cross-react with blood group A antigen. **48** (15): 4361-7.
- Takeya, A., Hosomi, O. and Kogure, T. 1987. *J Biochem (Tokyo)*. Identification and characterization of UDP-GalNAc: NeuAc alpha 2-3Gal beta 1-4Glc(NAc) beta 1-4(GalNAc to Gal)N-acetylgalactosaminyltransferase in human blood plasma. **101** (1): 251-9.
- Taniguchi, N. and Makita, A. 1984. *J Biol Chem*. Purification and characterization of UDP-N-acetylgalactosamine: globotriaosylceramide beta-3-N-acetylgalactosaminyltransferase, a synthase of human blood group P antigen, from canine spleen. **259** (9): 5637-42.
- Taylor-Papadimitriou, J., Burchell, J., Miles, D. W. and Dalziel, M. 1999. *Biochim Biophys Acta*. MUC1 and cancer. **1455** (2-3): 301-13.
- Ten Hagen, K. G., Bedi, G. S., Tetaert, D., Kingsley, P. D., Hagen, F. K., Balys, M. M., Beres, T. M., Degand, P. and Tabak, L. A. 2001. *J Biol Chem*. Cloning and characterization of a ninth member of the UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase family, ppGaNTase-T9. **276** (20): 17395-404.
- Ten Hagen, K. G., Hagen, F. K., Balys, M. M., Beres, T. M., Van Wuyckhuysse, B. and Tabak, L. A. 1998. *J Biol Chem*. Cloning and expression of a novel, tissue specifically expressed member of the UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase family. **273** (42): 27749-54.
- Ten Hagen, K. G., Tetaert, D., Hagen, F. K., Richet, C., Beres, T. M., Gagnon, J., Balys, M. M., VanWuyckhuysse, B., Bedi, G. S., Degand, P. and Tabak, L. A. 1999. *J Biol Chem*. Characterization of a UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase that displays glycopeptide N-acetylgalactosaminyltransferase activity. **274** (39): 27867-74.

- Ten Hagen, K. G., Tran, D. T., Gerken, T. A., Stein, D. S. and Zhang, Z. 2003. *J Biol Chem*. Functional characterization and expression analysis of members of the UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase family from *Drosophila melanogaster*. **278** (37): 35039-48.
- Tenno, M., Kezdy, F. J., Elhammer, A. P. and Kurosaka, A. 2002. *Biochem Biophys Res Commun*. Function of the lectin domain of polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 1. **298** (5): 755-9.
- Tettamanti, G. 2004. *Glycoconj J*. Ganglioside/glycosphingolipid turnover: new concepts. **20** (5): 301-17.
- Thoden, J. B. and Holden, H. M. 2005. *J Biol Chem*. The molecular architecture of human N-acetylgalactosamine kinase. **280** (38): 32784-91.
- Tian, E., Hagen, K. G., Shum, L., Hang, H. C., Imbert, Y., Young, W. W., Jr., Bertozzi, C. R. and Tabak, L. A. 2004. *J Biol Chem*. An inhibitor of O-glycosylation induces apoptosis in NIH3T3 cells and developing mouse embryonic mandibular tissues. **279** (48): 50382-90.
- Toba, S., Tenno, M., Konishi, M., Mikami, T., Itoh, N. and Kurosaka, A. 2000. *Biochim Biophys Acta*. Brain-specific expression of a novel human UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase (GalNAc-T9). **1493** (1-2): 264-8.
- Tuppy, H. and Staudenbauer, W. L. 1966. *Nature*. Microsomal incorporation of N-acetyl-D-galactosamine into blood group substance. **210** (33): 316-7.
- Uchiyama, T. and Hindsgaul, O. 1998. *J. Carb. Chem*. Rapid Conversion of Unprotected Galactose Analogs to their UDP-Derivatives for use in the Chemo-Enzymatic Synthesis of Unnatural Oligosaccharides. **17**: 1181-1190.
- Unligil, U. M. and Rini, J. M. 2000. *Curr Opin Struct Biol*. Glycosyltransferase structure and mechanism. **10** (5): 510-7.
- Van Heyningen, W. E. 1974. *Nature*. Gangliosides as membrane receptors for tetanus toxin , cholera toxin and serotonin. **249**: 415-417.
- Varki, A. 1993. *Glycobiology*. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. **3** (2): 97-130.
- Varki, A., Cummings, R., Esko, J., Freeze, H., Hart, G. and Marth, J. 1999. *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor Lab Press
- Velcich, A., Yang, W., Heyer, J., Fragale, A., Nicholas, C., Viani, S., Kucherlapati, R., Lipkin, M., Yang, K. and Augenlicht, L. 2002. *Science*. Colorectal cancer in mice genetically deficient in the mucin Muc2. **295** (5560): 1726-9.
- Vichier-Guerre, S., Lo-Man, R., Bay, S., Deriaud, E., Nakada, H., Leclerc, C. and Cantacuzene, D. 2000. *J Pept Res*. Short synthetic glycopeptides successfully induce antibody responses to carcinoma-associated Tn antigen. **55** (2): 173-80.

- Wandall, H. H., Hassan, H., Mirgorodskaya, E., Kristensen, A. K., Roepstorff, P., Bennett, E. P., Nielsen, P. A., Hollingsworth, M. A., Burchell, J., Taylor-Papadimitriou, J. and Clausen, H. 1997. *J Biol Chem*. Substrate specificities of three members of the human UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase family, GalNAc-T1, -T2, and -T3. **272** (38): 23503-14.
- Wang, H., Tachibana, K., Zhang, Y., Iwasaki, H., Kameyama, A., Cheng, L., Guo, J., Hiruma, T., Togayachi, A., Kudo, T., Kikuchi, N. and Narimatsu, H. 2003. *Biochem Biophys Res Commun*. Cloning and characterization of a novel UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase, pp-GalNAc-T14. **300** (3): 738-44.
- Wang, L. and Schultz, P. G. 2005. *angew. Chem. Int. Ed.* Expanding the genetic code. **44** (1): 34.
- Wang-Gillam, A., Pastuszak, I. and Elbein, A. D. 1998. *J Biol Chem*. A 17-amino acid insert changes UDP-N-acetylhexosamine pyrophosphorylase specificity from UDP-GalNAc to UDP-GlcNAc. **273** (42): 27055.
- White, K. E., Lorenz, B., Evans, W. E., Meitinger, T., Strom, T. M. and Econs, M. J. 2000. *Gene*. Molecular cloning of a novel human UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase, GalNAc-T8, and analysis as a candidate autosomal dominant hypophosphatemic rickets (ADHR) gene. **246** (1-2): 347-56.
- White, T., Bennett, E. P., Takio, K., Sorensen, T., Bonding, N. and Clausen, H. 1995. *J Biol Chem*. Purification and cDNA cloning of a human UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase. **270** (41): 24156-65.
- Wieruszkeski, J. M., Michalski, J. C., Montreuil, J. and Strecker, G. 1990. *Glycoconjugate Journal*. H-1 and C-13-Nmr Analysis of 4 Pentasaccharides from Urine of Blood-Group-a and Blood-Group-B, Blood-Group-Leb Adults - Confirmation of the Structure of 2 New Oligosaccharides - Fuc(Alpha-1-2) Galnac(Alpha-1-3) Gal(Beta-1-3) Fuc(Alpha-1-4) Glc and Fuc(Alpha-1-2) Gal(Alpha-1-3) Gal(Beta-1-3) Fuc(Alpha-1-4) Glc. **7** (1): 13-26.
- Wong, C. H., Haynie, S. L. and Whitesides, G. M. 1982. *J. Org. Chem.* Enzyme-catalyzed synthesis of N-acetylglucosamine with in situ regeneration of uridine 5'-diphosphate glucose and uridine 5'-diphosphate galactose. **47**: 5416-5418.
- Wopereis, S., Lefeber, D. J., Morava, E. and Wevers, R. A. 2006. *Clin Chem*. Mechanisms in protein O-glycan biosynthesis and clinical and molecular aspects of protein O-glycan biosynthesis defects: a review. **52** (4): 574-600.
- Wreschner, D. H., Hareuveni, M., Tsarfaty, I., Smorodinsky, N., Horev, J., Zaretsky, J., Kotkes, P., Weiss, M., Lathe, R., Dion, A. and et al. 1990. *Eur J Biochem*. Human epithelial tumor antigen cDNA sequences. Differential splicing may generate multiple protein forms. **189** (3): 463-73.
- Yamamoto, F., Clausen, H., White, T., Marken, J. and Hakomori, S. 1990. *Nature*. Molecular genetic basis of the histo-blood group ABO system. **345** (6272): 229-33.
- Yuan, Y., Wen, X., Sanders, D. A. and Pinto, B. M. 2005. *Biochemistry*. Exploring the mechanism of binding of UDP-galactopyranose to UDP-galactopyranose mutase by STD-NMR spectroscopy and molecular modeling. **44** (43): 14080-9.

Zhang, J., Kowal, P., Chen, X. and Wang, P. G. 2003a. *Org Biomol Chem*. Large-scale synthesis of globotriose derivatives through recombinant E. coli. **1** (17): 3048-53.

Zhang, Y., Iwasaki, H., Wang, H., Kudo, T., Kalka, T. B., Hennet, T., Kubota, T., Cheng, L., Inaba, N., Gotoh, M., Togayachi, A., Guo, J., Hisatomi, H., Nakajima, K., Nishihara, S., Nakamura, M., Marth, J. D. and Narimatsu, H. 2003b. *J Biol Chem*. Cloning and characterization of a new human UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase, designated pp-GalNAc-T13, that is specifically expressed in neurons and synthesizes GalNAc alpha-serine/threonine antigen. **278** (1): 573-84.

« Développement d'un système de régénération d'UDP-GalNAc pour la glycosylation enzymatique d'oligosaccharides et de peptides d'intérêt thérapeutique. »

RESUME :

Le GalNAc est présent dans un grand nombre de glycoprotéines, protéoglycanes et glycolipides. Il est le sucre immunodominant des antigènes de groupes sanguins et oncofoetaux qui sont des cibles thérapeutiques. Cependant, la synthèse par voie chimique de ces glycoconjugués à GalNAc est longue et coûteuse. *In vivo*, le GalNAc est incorporé par des GalNAc transférases, enzymes spécifiques qui transfèrent le GalNAc de l'UDP-GalNAc sur un substrat accepteur. Mais la synthèse chimio enzymatique des glycanes est freinée par l'obtention difficile de quantités importantes d'UDP-GalNAc.

Nous avons mis au point un système de synthèse chimio enzymatique de glycoconjugués à GalNAc qui utilise 4 enzymes et des substrats simples comme le GalNAc, l'UTP et la créatine-P. Ce système permet la synthèse rapide et efficace de glycopeptides et d'oligosaccharides à GalNAc ; il a été utilisé pour glycosyler l'antigène MUC1 et nous avons pu évaluer la réponse immunitaire murine contre la petite glycoprotéine obtenue.

Le système de synthèse d'UDP-GalNAc peut accepter certains dérivés de GalNAc et permettre ainsi la synthèse d'analogues d'UDP-GalNAc. Ces molécules sont des sondes appréciables pour étudier l'interaction entre substrats et enzymes par les techniques physicochimiques comme la STD-NMR.

MOTS-CLES : Synthèse chimio-enzymatique, glycoconjugué, mucine, GalNAc-transférase, protéines recombinantes, analogues d'UDP-GalNAc, sondes de glycosyltransférases, STD-NMR.

« Development of a regeneration system for UDP-GalNAc for the enzymatic glycosylation of oligosaccharides and peptides of therapeutic interest. »

ABSTRACT :

The sugar *N*-acetylgalactosamine (GalNAc) is a constituent of many glycoproteins, glycolipids and proteoglycans. It is the immunodominant sugar in blood group and oncofetal antigens which are potential therapeutic targets. However, the chemical synthesis of these antigens is time consuming and expensive. *In vivo*, GalNAc is incorporated into glycoconjugates by specific GalNAc transferases using UDPGalNAc as the donor substrate. At present, the chemo-enzymatic synthesis of glycans is hampered by the difficulties involved in the synthesis of large amounts of UDP-GalNAc. To overcome these limitations we have developed the chemo-enzymatic synthesis of GalNAc bearing glycoconjugates based on the simple substrates GalNAc, UTP and creatine-P and the use of four enzymes. In this method UDP-GalNAc is synthesized as an intermediate and the product UDP immediately recycled to UDP-GalNAc. With this technique an oligosaccharide and several mg of a small glycoprotein were synthesized and the immune response of mice to the synthesized glycoprotein investigated. The system developed to synthesize the UDP-GalNAc intermediate could be adapted to produce large amounts of UDP-GalNAc and we could show that it accepts also derivatives of GalNAc which allows the rapid synthesis of UDP-GalNAc analogues. These molecules have been tested as probes for the active site of polypeptide α GalNAc transferase T1 by kinetic studies and by STD-NMR.

KEY-WORDS : Chemoenzymatic synthesis, glycoconjugate, mucin, GalNAc-transferase, recombinant proteins, UDP-GalNAc analogues, glycosyltransferase probes, STD-NMR.

DISCIPLINE - SPECIALITE DOCTORALE : Biochimie

INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R. OU DU LABORATOIRE : Centre de Biophysique Moléculaire CNRS UPR 4301, rue Charles Sadron 45071 Orléans Cedex 02.