



HAL
open science

Synthèse de glycanes sulfatés par le procédé d’’usine cellulaire’’

Ludovic Bastide

► **To cite this version:**

Ludovic Bastide. Synthèse de glycanes sulfatés par le procédé d’’usine cellulaire’’. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Grenoble, 2011. Français. NNT : 2011GRENV003 . tel-00600595

HAL Id: tel-00600595

<https://theses.hal.science/tel-00600595v1>

Submitted on 15 Jun 2011

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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Chimie-Biologie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Ludovic BASTIDE

Thèse dirigée par **Dr Bernard PRIEM**

préparée au sein du **Centre de Recherche sur les
Macromolécules Végétales**
dans **l'École Doctorale Chimie Sciences du Vivant**

Synthèse de glycanes sulfatés par le procédé d' « usine cellulaire »

Thèse soutenue publiquement le **04 Février 2011**
devant le jury composé de :

Mr Franck FIESCHI

Professeur, IBS, Grenoble, Président

Mme Claire BOISSET

Ingénieur de recherche, IFREMER, Plouzané, Rapporteur

Mr Michel-Pierre DION

Professeur, Université de Nantes, Rapporteur

Mr Bernard PRIEM

Maitre de conférences, CERMAV, GRENOBLE, Examineur

Mr Sébastien FORT

Chargé de recherche, CERMAV, GRENOBLE, Invité



Ce travail de recherche a été réalisé au Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales sous la direction du Dr Bernard Priem

Avant d'exposer les résultats de mes travaux, je tenais à remercier tous ceux qui, d'une manière ou d'une autre, ont contribué à sa réalisation durant ces trois années de dur labeur et d'immense plaisir.

Un grand merci à Bernard Priem, directeur de cette thèse, qui m'a donné le privilège de participer à cette grande aventure qui a connu de nombreux rebondissements au cours des trois années. Son encadrement technique, son savoir et son talent ont permis à ce travail d'aboutir. Nos discussions existentielles et nos expériences paternelles ont été précieuses et enrichissantes. Je lui adresse toute mon amitié.

J'exprime ma profonde gratitude à Monsieur Sébastien Fort. Sa très grande disponibilité, sa grande passion, son savoir et son talent ont été une aide précieuse et indispensable à l'aboutissement de certains travaux. Je le prie d'être assuré de ma sincère reconnaissance.

Je remercie Madame Claire Boisset, Messieurs Michel Dion et Hugues Lortat-Jacob d'avoir accepté de juger ce travail. De par leur notoriété, je suis très honoré qu'ils aient accepté. Qu'ils trouvent ici le témoignage de ma reconnaissance.

Je remercie Monsieur Rédouane Borsali de m'avoir accueilli dans son laboratoire.

Ma reconnaissance va également à toute l'équipe de Chimie et Biotechnologie des Oligosaccharides dirigée par Monsieur Hugues Driguez puis par Monsieur Sébastien Fort.

Un grand merci à Madame Sylvie Armand pour ses conseils constructifs et pour sa disponibilité à chaque fois que j'ai eu à solliciter ses compétences.

Merci également à Messieurs Eric Samain, Gérard Chambat et Alain Heyraud pour leur aide précieuse et leurs conseils scientifiques. Le savoir est une chose qu'ils ont su partager avec plaisir.

Je remercie également Mesdames Aurélie Bouchet, Patricia Chaud et Monsieur Sylvain Cottaz qui ont rendu mon séjour au CERMAV très agréable.

Mention particulière pour Mademoiselle Laurine Buon et Monsieur Sami Halila, qui au-delà de leur aide et de leurs compétences indispensables, ont su trouvé le temps de m'écouter et me supporter dans les moments de bonheur et de galère.

Je remercie également Mesdames Stéphanie Boulanger et Isabelle Jeacomine pour leur aide et leur compétence qui m'ont été d'une grande utilité.

Un grand merci à tous mes collègues en particulier Nathalie Claisse, Héléne Barreteau, Anne-Laure Wirotius, Stéphanie Pradeau, Caroline Gebus, Claire Cottin, Tinaig Lecostaouec, Mialy Randriantsoa, Alexandre Guerry, Samuel Medeiros, Renato Eising, Eduardo Andres qui ont pris une part active aux opérations et qui ont fait régner une agréable ambiance de travail. Tous les moments que nous avons passés ensemble au travail et en dehors resteront à jamais gravés dans mes pensées.

Je remercie toutes les personnes qui, au laboratoire, ont contribué à rendre ces années agréables notamment le groupe des doctorants et tout le personnel administratif.

Parce qu'ils sont nombreux à m'avoir soutenu tout au long de cette aventure, je ne pourrai pas les nommer tous mais que chacun soit assuré de ma reconnaissance.

Enfin une pensée particulière à ma petite famille. A toi, Estelle, un grand merci pour ton soutien moral qui m'a été vraiment primordial durant les moments difficiles. Merci d'avoir partagé mes joies et supporté mes peines.

Merci à mes parents d'avoir toujours cru en moi.

Et finalement merci à toi, Eléane, ma fille, sans qui ces trois ans de thèse n'auraient pas été les mêmes. A nos longues discussions nocturnes au coin du lit, à tes bêtises, à tes chagrins, à tes fous rires, à tes câlins, à ton sourire de tous les jours, merci.

Abréviations

Ac Acétyle
AcEt Acétate d'éthyle
ACN Acétonitrile
ADP Adénosine diphosphate
ATP Adénosine triphosphate
CCM Chromatographie sur couche mince
CDCl₃ Chloroforme deutéré
CS Sulfate de chondroïtine
DMAP 4-diméthylaminopyridine
DMF N,N-Diméthylformamide
DMSO Diméthylsulfoxyde
DS Sulfate de dermatane
E.coli *Escherichia coli*
ED Eau distillée
EP Ether de pétrole
EPS Exopolysaccharide
eq Equivalent molaire
ES Electrospray
Et Ethyle
Fuc Fucose
GAG Glycosaminoglycane
Gal Galactose
Gal-3ST Galactosyl-3-sulfotransférase
GalNAc N-acétylgalactosamine
GlcA-Lac glucuronyle lactose
GlcNAc N-acétylglucosamine
GlcNAcT N-acétylglucosaminyltransférase
Glc Glucose
GlcA Acide glucuronique
h Heure
HNK-1 Human Natural Killer-1
HS Sulfate d'héparane
IPTG Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside
HS Sulfate d'héparane
j Jour
J Constante de couplage
kDa Kilodalton

KS Sulfate de kératine
Lac Lactose
LacNAc *N*-acétyllactosamine
LNnT Lacto-*N*-néotétraose
Le^x Lewis x
LPS Lipopolysaccharides
Me Méthyle
PAP 3'-phospho-adénosine-phosphate
PAPS 3'-Phospho-adénosine-5'-phosphosulfate
Ph Phényle
pNP 4-nitrophénol
ppm partie par million
RMN Résonance Magnétique Nucléaire
S.cerevisiae *Saccharomyces cerevisiae*
SM Spectrométrie de masse
ST Sulfotransférase
TA Température ambiante
TCA Trichloroacétyle
TFA Acide trifluoroacétique
THF Tétrahydrofurane
UDP Uridine-5'-diphosphate
UTP Uridine-5'-triphosphate

Sommaire

Abréviations	4
Sommaire	8
Avant-propos.....	14
Introduction.....	18
I. Importance biologique des glycanes sulfatés.....	20
1. Les glycanes	20
2. Les structures sulfatées	22
1. Généralités	22
2. L'hormone lutéinisante	24
3. Les glycosaminoglycannes.....	25
4. Les sulfoglycolipides	27
5. Les facteurs de nodulation	29
6. Le HNK1	29
7. Les 6-sulfo sialyl Lewis x	31
3. Les rôles biologiques des glycanes sulfatés.....	32
1. Rôle de l'hormone lutéinisante	32
2. Rôle des glycosaminoglycannes	33
3. Rôle des sulfoglycolipides	36
4. Rôle des facteurs de nodulation.....	36
5. Rôle du HNK-1	37
6. Rôle du 6'sulfo sialyl Lewis x.	39
II. Les sulfotransférases	40
1. Les sulfotransférases eucaryotes.....	40
1. Les STs cytosoliques eucaryotes ou SULFs	43
2. Les STs membranaires eucaryotes	44
a) GalNAc-4-sulfotransférase.....	44
b) Les 3-O-sulfotransférases HNK-1ST	45
c) GlcNAc-6ST.....	48
2. Les sulfotransférases procaryotes	51
1. Rv1373.....	51
2. GlcNAc-6-sulfotransférase	52
3. KpsS.....	54
3. Activités enzymatiques.....	54
1. Dosage colorimétrique	54
2. Isotope radioactif	55
III. Métabolisme du PAPS.....	56
1. Les acides aminés comme source de sulfate.....	57
2. Le rôle du sulfate dans la synthèse du PAPS	57
3. La disponibilité du PAPS	57
1. L'ATP-sulfurylase	58
2. L'APS-kinase	59
3. Le couplage entre l'ATP-sulfurylase et l'APS-kinase.....	59
4. Les gènes <i>cys</i>	59
5. Les gènes <i>nod</i>	60
6. Les gènes <i>met</i>	61

IV. L'usine cellulaire	62
1. Le concept	62
2. Internalisation de l'accepteur	62
3. Les glycosyltransférases	63
4. Les voies de biosynthèse des nucléotide-sucres	64
1. Biosynthèse de l'UDP-GlcNAc	64
2. Biosynthèse de l'UDP-Gal.....	65
3. Biosynthèse du GDP-fucose	65
4. Biosynthèse de l'UDP-GlcA.....	66
5. La culture à haute densité	66
6. Les oligosaccharides produits par la méthode d'usine cellulaire	68
7. L'utilisation des oligosaccharides comme accepteurs de sulfatation.....	69
8. La levure <i>S.cerevisiae</i>	69
RESULTATS ET DISCUSSION	72
I. Essai de sulfatation chez <i>Escherichia coli</i> K12	74
1. Biosynthèse totale <i>in vivo</i> de l'épitope HNK-1	74
1. Biosynthèse et disponibilité des précurseurs de sulfatation	74
a) Biosynthèse du GlcA-Lac.....	75
b) Biosynthèse du GlcA-Lac-Allyle.....	77
2. Essais de sulfatation	82
a) HNK-1ST de <i>Rattus norvegicus</i>	82
b) HNK-1ST humaine synthétique.....	86
i. Essai de sulfatation sur le GlcA-Lac	87
ii. Fusion avec la GST	88
iii. Etudes de l'expression de la HNK-1ST humaine	89
2. Biosynthèse du 6'sulfo sialylLewisX.....	92
1. Essais de sulfatation avec CHST4.....	92
3. Biosynthèse des sulfatides.....	96
1. Essais de sulfatation avec la Rv1373 de <i>M.tuberculosis</i>	96
a) Sulfatation du Lac-Allyle	97
b) Sulfatation du Lac-Propargyle.....	99
c) Sulfatation du Gal-Propargyle.....	100
d) Sulfatation de l'IPTG	101
4. Biosynthèse de structures bactériennes	102
1. Essais de sulfatation avec KpsS	103
II. Sulfatation chimique	106
1. Synthèse chimique du 3-sulfo-GlcA-Lac-Allyl	107
2. Synthèse des néoglycoprotéines porteuses des analogues de l'épitope HNK-1	108
3. Tests ELISA avec des anticorps HNK-1	109
III. Essais de sulfatation chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.....	111
1. Biosynthèse et disponibilité des précurseurs de sulfatation	111
1. Mise au point des conditions standards de fermentation	112
2. Internalisation du lactose.....	114
3. Biosynthèse du GlcA-Lac	116
4. Biosynthèse du GlcNAc-Lac	117
2. Essais de sulfatation	118
1. Gal-3ST	118

CONCLUSION	120
1. Essais de sulfatation chez <i>E.coli</i>	122
1. HNK-1ST.....	122
a) HNK-1ST de rat.....	122
b) HNK-1ST humaine.....	123
2. GlcNAc-6ST.....	124
3. Hrv1373.....	125
4. KpsS.....	125
2. Ingénierie métabolique chez <i>S.cerevisiae</i>	125
3. Toxicité du PAPS.....	127
4. Synthèse chimio-enzymatique d'un analogue de l'épitope HNK-1.....	128
5. Détection et purification des glycannes sulfatés.....	129
 MATERIELS ET METHODES.....	 132
I. Construction des souches recombinantes.....	134
1. Méthodes de biologie moléculaire.....	134
1. Clonage des gènes.....	134
2. Sous-clonage des gènes dans les vecteurs d'expression.....	137
a) Expression chez <i>E.coli</i>	137
b) Expression chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	139
2. Cellules hôtes.....	140
1. Bactéries <i>E.coli</i>	140
2. Levure <i>S.cerevisiae</i>	140
3. Préparation des cellules compétentes et transformation.....	140
1. Préparation des bactéries compétentes.....	140
a) Méthode avec le tampon TB.....	141
b) Méthode avec le tampon TSS.....	141
2. Transformation des bactéries.....	141
3. Préparation des levures compétentes.....	141
4. Transformation des levures.....	142
4. Screening des souches par PCR sur colonie.....	142
II. Culture à haute densité	143
1. Paramètres de culture.....	143
2. Composition des milieux de culture.....	143
3. Suivi de la culture.....	144
4. Analyse des prélèvements par chromatographie sur couche mince.....	144
III. Purification des oligosaccharides.....	144
1. Extraction par adsorption sur charbon actif.....	144
2. Purification par chromatographie d'exclusion.....	145
3. Purification par chromatographie échangeuse d'ions.....	145
4. Purification par chromatographie flash.....	145
IV. Caractérisation des oligosaccharides	145
1. Analyse par spectrométrie de masse.....	145
2. Spectres RMN.....	146
V. Test Enzyme-Linked Lectin Assay (ELLA)	146
VI. Dosages.....	147
1. Dosage des acides uroniques.....	147

2.	Dosage des protéines	147
3.	Dosage des sucres totaux	147
VII.	Sulfatation chimique.....	148
VIII.	Conjugaison des oligosaccharides avec la sérum albumin bovine	151
IX.	Gel d'électrophorèse et westernblot	151
	<i>BIBLIOGRAPHIE.....</i>	<i>154</i>
	<i>COMMUNICATIONS A DES CONGRES SCIENTIFIQUES</i>	<i>172</i>

Avant-propos

Les travaux de thèse, présentés ici, ont été réalisés au cours d'un programme financé par la Région Rhône-Alpes dans le cadre d'un projet CIBLE (2007), intitulé « Synthèse de glycanes sulfatés dans le cadre de l'usine cellulaire ». Le projet vise à synthétiser des glycanes sulfatés ou des glycoconjugués analogues de manière à enrichir une banque de glucides mise à disposition pour les biologistes.

Dans le contexte des neuropathologies liées à la mise en place, au fonctionnement et à la régénération du système nerveux central et périphérique, l'étude des mécanismes moléculaires et signalétiques liés aux glucides sulfatés est très importante. Ceux-ci sont impliqués dans les voies de signalisation de la reconnaissance cellulaire. Un des aspects de ces études est de permettre, notamment avec le HNK-1, de restaurer qualitativement et quantitativement une régénération des motoneurones après lésion.

Ces travaux s'inscrivent dans la continuité des études effectuées au laboratoire depuis de nombreuses années focalisées sur la synthèse d'oligosaccharides dans le cadre de l'usine cellulaire. Parmi la banque d'oligosaccharides et de glycoconjugués importante, synthétisés par voie biologique chez *E.coli* à l'aide de glycosyltransférases principalement, disponible au laboratoire, la branche des glycanes sulfatés est peu étoffée.

Dans le cadre du projet CIBLE, cette étude a pour objectif de développer une technologie de production des glycanes sulfatés d'intérêt par voie microbiologique. Cette méthode a pour avantage de synthétiser en une seule étape des oligosaccharides en quantité importante et à faible coût. L'étape de sulfatation sera éventuellement réalisée par une synthèse chimique, autre thématique forte de notre équipe de Chimie et Biotechnologie des Oligosaccharides.

Nous nous sommes, durant ces trois années de thèse, intéressés à la synthèse du motif oligosaccharidique HNK-1, et de ses glycoconjugués analogues, ainsi qu'à la synthèse du sulfo-sialyl-Lewis^X. D'autres essais de sulfatation enzymatique ont été abordés dans une moindre mesure.

La préparation de néoglycoprotéine porteuse de l'épitope HNK-1 sera plus particulièrement présentée. Ce composé est en effet actuellement en cours d'évaluation biologique par nos partenaires biologistes.

Introduction

I. Importance biologique des glycanes sulfatés

1. Les glycanes

Les oligosaccharides sont des chaînes formées d'un certain nombre d'oses (de monosaccharides) par une liaison α ou β . Les chaînes formées varient en longueur allant de quelques sucres à plusieurs centaines. Pendant longtemps, le rôle des glucides a été cantonné à celui de source d'énergie. En effet les glucides constituent l'un des trois principaux nutriments énergétiques et fournissent et stockent de l'énergie. Il est aujourd'hui largement admis que les glycanes libres et leurs conjugués (les glycoconjugués) jouent également des rôles très importants dans de nombreux processus biologiques. Le monde extérieur des cellules animales est un milieu intensément social et bruyant des discussions intercellulaires. Les cellules doivent à la fois maintenir une vitalité collective et supprimer l'anarchie. Malgré le chaos potentiel de la vie extracellulaire, un ordre et une solidarité surviennent grâce à une gestion précise et efficace des communications entre ces cellules. Cette communication dépend souvent de la diffusion passive de solutés vers leurs cibles, mais nécessite des récepteurs liés à la cellule qui capturent de manière efficace et spécifique ces ligands à la volée. Une réponse a été apportée par l'émergence de la matrice extracellulaire polyvalente (ECM) qui fournit un soutien mécanique et un milieu poreux de diffusion, ainsi que des épitopes spécifiques nécessaires à la communication intercellulaire. Ce monde extérieur présente un assortiment prépondérant de glycanes qui peuplent tous les coins de l'espace extracellulaire. Cependant les oligosaccharides sont rarement libres, le plus souvent ils sont liés de façon covalente à des lipides ou à des protéines (glycolipides ou glycoprotéines). Les cellules présentent un éventail de glycolipides et de glycoprotéines à leur surface. Collectivement, ils forment une matrice dense, appelé le glycocalyx, qui fonctionne comme une interface entre une cellule et l'environnement dans lequel la cellule négocie sa croissance, sa survie et sa mort. Les glucides sont essentiels à pratiquement tous les aspects du trafic extracellulaire, remplissant des rôles purement structuraux à la médiation d'événements très spécifiques comme la reconnaissance qui sous-entend une communication cellulaire. La nature a bien choisi car les sucres sont particulièrement bien adaptés à la médiation d'une si extraordinaire variété d'interactions: ils sont modulaires, similaires à des nucléotides et des acides aminés. En outre une des fonctionnalités caractéristique des sucres liés aux protéines et aux lipides est le nombre quasi infini de structures distinctes qui peuvent être produites en assemblant les différentes combinaisons de monosaccharides en oligosaccharides. Le nombre de possibilité de combinaison est énorme à cause du nombre important de différents monosaccharides disponibles, du nombre de type de liaison différente entre ces monosaccharides et le fait qu'ils peuvent être branchés en un ou plusieurs points. Des modifications comme la phosphorylation, la sulfatation, la méthylation ou l'acétylation ajoutent à la complexité structurale. Cependant cette énorme diversité structurale des oligosaccharides fait d'eux de

parfaites molécules porteuses d'informations. Notamment il a été également décrit que des changements dans la glycosylation sont souvent la marque d'états pathologiques. Par exemple, les cellules cancéreuses affichent souvent des glycannes à des niveaux d'expression différents ou avec des structures fondamentalement différentes de celles observées sur les cellules normales. Ce phénomène a été décrit dans le début des années 1970, mais les détails moléculaires sous-jacents de ces transformations ont été mal compris. Dans les 10 dernières années, les progrès en génomique, protéomique et analytique ont permis l'association des structures de glycannes spécifiques à des états pathologiques. Dans certains cas, la signification fonctionnelle des changements associés à la maladie dans la glycosylation a été révélée, notamment pour le cancer et l'inflammation chronique. Les glycobiochimistes essaient de décoder ces modifications de structure des glycannes de manière à éradiquer les maladies associées. Leurs résultats inspirent de nouvelles méthodes de détection des glycannes caractéristiques des différents états de la maladie. Une fois identifiés, la formation de ces glycannes pourra être stoppée et les cellules malades porteuses de ces structures pourront être détruites. Cependant la recherche des fonctions biologiques des motifs oligosaccharidiques est toutefois rendue difficile car ces structures présentes sur les glycoprotéines individuelles ou des glycolipides sont généralement très hétérogènes. Il est rare d'observer une structure unique, même sur un seul site de glycosylation sur une glycoprotéine. Malgré ces défis, de nombreux oligosaccharides ont été démontrés comme ayant des fonctions biologiques. Cette spécificité importante donne au répertoire oligosaccharide de la surface cellulaire, que ce soit sous forme de glycoprotéines ou des glycolipides, un rôle majeur dans les processus biologiques. Ils sont reconnus par des anticorps ou des lectines, et jouent un rôle crucial dans le déclenchement de la réponse de l'organisme. Par exemple, l'adhésion des microbes à la surface cellulaire de l'hôte, étape incontournable dans le processus de colonisation, et la glycosylation des glycolipides et glycoprotéines de la surface intestinale semblent être étroitement liées. Les glycosaminoglycannes, des oligosaccharides hétérogènes omniprésents à la surface de nos cellules et dans la matrice extracellulaire, ont des rôles très variés selon leur localisation et leur structure. Ils peuvent permettre la coagulation du sang ou l'activation de facteurs de croissance (FGF) ou de cytokines.

Ces fonctions biologiques sont généralement associées à la présence d'oligosaccharides avec des caractéristiques structurelles uniques, tels que des motifs sulfatés ou phosphatés, qui font partie d'un déterminant qui est reconnu par un ou plusieurs récepteur(s) spécifique(s).

2. Les structures sulfatées

1. Généralités

Les glycolipides et glycoprotéines contenant du sulfate sont en pleine expansion. Bien que les glycannes sulfatés soient connus pour être présents sur les protéoglycannes et les mucines, on a découvert récemment leur présence sur un large éventail gamme de glycoprotéines et glycolipides produits par de nombreux tissus et cellules différents. En outre, les motifs glycaniques sulfatés sont retrouvés chez de nombreux organismes différents, de la bactérie à l'homme. Il existe une variabilité considérable parmi les structures d'oligosaccharides sulfatés, dont chacun a le potentiel d'être reconnu par un récepteur différent ou une lectine, et présente une fonction biologique différente. La structure des glycannes contenant du sulfate varie en fonction des monosaccharides qui sont modifiés [par exemple, le galactose (Gal), la N-acétylgalactosamine (GalNAc), la N-acétylglucosamine (GlcNAc), le mannose (Man), etc], en fonction de l'hydroxyle qui est lié au sulfate (par exemple, 3-OH, le 4-OH, etc), et en fonction de la structure de la fraction oligosaccharidique du reste de la molécule. La diversité de structures sulfatées reste à définir mais est très grande.

Le sulfate (SO_4) est transféré aux accepteurs oligosaccharides grâce aux sulfotransférases (STs) qui utilisent la 3'-phosphoadénosine-5'-phosphosulfate (PAPS) comme donneur de sulfate de haute énergie. L'addition de sulfate est un événement tardif au cours de la biosynthèse qui se produit dans la lumière de l'appareil de Golgi (Schwarz, 1984). Une fois synthétisés le long de la voie de sécrétion, les glucides d'esters de sulfates se trouvent exclusivement dans le milieu de la matrice extracellulaire, et la sulfatation des glucides pourrait être parmi les mécanismes choisis par la nature pour relever les défis de communication multicellulaire. Les esters de sulfate ont de nombreuses propriétés utiles. Entièrement anioniques à pH physiologique, ils fournissent un composant électrostatique à des interactions spécifiques sans se comporter comme une base ou un nucléophile. Leur liaison sur une structure glycanique permet une disposition spatiale de deux ou plusieurs anions sulfate qui contribuent à la structure du ligand dans l'ensemble, un moyen efficace de générer de nombreuses structures uniques à partir de quelques éléments modulaires. Le grand nombre de structures sulfatées déjà connues et la présence de ces structures uniquement sur un nombre limité de glycoprotéines produites par une cellule ou un tissu donné indiquent que les sulfotransférases qui modulent l'addition de sulfate aux oligosaccharides des glycoprotéines sont nombreuses et très spécifiques. Des exemples de glycoprotéines portant des oligosaccharides sulfatés sont présentés dans le tableau 1.

Sulfated monosaccharide	Glycoproteins/glycolipids known to contain this monosaccharide
Gal-3-SO ₄ SO ₄ -3-Galβ1,4GlcNAcβ-R SO ₄ -3-Galβ1,4[Fucα1,3]GlcNAcβ-R SO ₄ -3-Galβ1-1Cer	Thyroglobulin N-linked glycans Ovarian cystadenoma glycoproteins Sulfatides
GalNAc-4-SO ₄ SO ₄ -4-GalNAcβ1,4GlcNAcβ-R	N-linked glycans of LH, TSH, carbonic anhydrase VI, and urokinase Proopiomelanocortin N- and O-linked glycans
GalNAc-6-SO ₄ Galβ1,4[SO ₄ -6-]GlcNAcβ-R 6'-sulfo-sialyl Lewis ^x GlcNAcGlcNAc ₂ [SO ₄ -6-]GlcNAc COC _{15:2}	N-linked glycans of thyroglobulin () and HIV gp GlyCAM-1 O-linked glycans <i>Rhizobium meliloti</i> lipo-oligosaccharide nodulation factor
Gal-6-SO ₄ 6'-sulfo-sialyl Lewis ^x	GlyCAM-1 O-linked glycans
Man-4-SO ₄	Ovalbumin N-linked glycans
Man-6-SO ₄	N-linked glycans of <i>Dictyostelium discoideum</i> glycoproteins
GlcUAc-3-SO ₄ SO ₄ -3-GlcUAβ1,4Galβ1,4GlcNAcβ-R	P ₀ glycoprotein N-linked glycans Brain glycosphingolipids

Tableau 1 : exemples de quelques monosaccharides sulfatés identifiés sur des glycoprotéines et des glycolipides (Hooper, 1996).

Les sucres sulfatés modulent ainsi de nombreux événements moléculaires très spécifiques de reconnaissance, et, à partir d'une enquête sur les interactions connues dépendantes du sulfate, deux thèmes fonctionnels ont émergés. Le premier thème est la biosynthèse combinatoire de nombreuses sulfoformes de glucides dans la chaîne de glycosaminoglycannes (GAG). Ils représentent collectivement une bibliothèque de structures uniques (le terme sulfoforme désigne des structures de glycannes sulfatés qui ne diffèrent que par leur mode de sulfatation. Le deuxième thème est la conversion d'un oligosaccharide commun en un ligand unique par sulfatation. Par exemple, la sulfatation d'un résidu terminal N-acétylgalactosamine (GalNAc) sur les glycoprotéines des hormones de l'hypophyse régule leur demi-vie sérique en créant un déterminant unique qui est reconnu sélectivement par un récepteur hépatique sulfo-dépendant. Ces thèmes sous-tendent une multitude de processus, de l'angiogenèse et de la métastase des tumeurs à l'adhérence des leucocytes à l'endothélium sur les sites d'inflammation, en passant par les interactions symbiotiques entre les plantes et les bactéries fixatrice de nitrogène. En conséquence, les sulfotransférases des glycannes qui génèrent ces épitopes sont devenues un centre d'intérêt intense. Les rôles des sulfotransférases dans la modulation des processus normaux et pathogènes les ont amenés au premier plan de la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques. Une étude bibliographique est présentée ici sur les connaissances actuelles des structures glycaniques sulfatées présentes sur des glycoconjugués, ainsi que sur les fonctions biologiques de ces sulfoformes glucidiques dans des processus biologiques bien définis. En effet en comprenant la nature moléculaire des récepteurs à base de sucres à la surface des cellules,

leurs régulations au cours des stades développementaux, l'influence de l'environnement sur l'expression du récepteur, et leurs réponses effectrices dans la cellule et la signification biologique de la réponse de celles-ci, de nouvelles approches thérapeutiques pourraient bientôt être disponibles. Des débouchés apparaissent alors vers des applications en diagnostic, en thérapies antiadhésives ou même vers des vaccins pour la prévention et le traitement de nombreuses maladies.

2. L'hormone lutéinisante

Des glycanes sulfatés ont été identifiés dans un système biologique avec l'hormone LH. LH est essentielle pour la régulation de nombreux processus physiologiques impliqués dans la reproduction, y compris la maturation folliculaire, l'ovulation, et la sécrétion d'œstradiol et de progestérogène.

LH est un membre de la famille des hormones glycoprotéiques comprenant également l'hormone stimulant la thyroïde (TSH), l'hormone folliculo-stimulante (FSH), et la gonadotropine chorionique (CG) (Pierce, 1981). La LH porte un motif oligosaccharide unique N-lié se terminant par la séquence $\text{SO}_4\text{-4GalNAc}\beta\text{1,4GlcNAc}$ (fig 1) (Stockell Hartree, 1992).

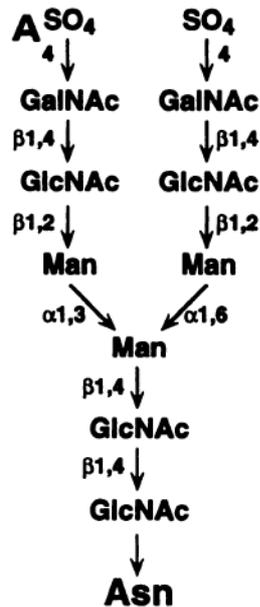


Figure 1 : structure des oligosaccharides sulfatés N-liés à l'hormone lutéinisante (LH). Les oligosaccharides N-liés sur la LH se terminent avec la séquence unique GalNAc-4-SO₄, qui a été démontrée comme responsable de l'élimination rapide de la LH de la circulation (Hooper, 1996).

Des études ont montré que la courte demi-vie circulatoire de la LH est le résultat de la présence d'oligosaccharides LH sulfatés plutôt que sialylés (Baenziger, 1992). L'influence de la séquence terminale oligosaccharidique N-liée sur la demi-vie de circulation de LH a suggéré l'existence d'un récepteur spécifique pour le terminal GalNAc-4-SO₄, qui élimine rapidement

l'hormone de la circulation sanguine. Un récepteur avec les propriétés prévues a été identifié (Fiete, 1992) et est hautement spécifique de la séquence $\text{SO}_4\text{-4-GalNAc}\beta\text{1,4GlcNAc}\beta\text{1,2Man}$, alors que la structure identique se terminant avec un sulfate lié à l'hydroxyle 3-OH n'est pas reconnue. Cela indique que le sulfate doit être attaché à un hydroxyle spécifique sur le GalNAc afin d'être reconnu par ce récepteur.

3. Les glycosaminoglycannes

L'avancée de la génomique en biologie cellulaire, liée à des avancées technologiques importantes, a fait prendre conscience que des composés glycaniques complexes tels que les glycosaminoglycannes (GAGs) pourraient avoir un rôle biologique fondamental, au même titre que les protéines ou les acides nucléiques. Ainsi, les GAGs, composants primaires de la matrice extracellulaire (MEC) interagissent avec de nombreuses protéines et modulent leur activité, prenant ainsi part à des processus biologiques complexes tels que le développement des organismes, l'angiogenèse, la croissance axonale, ou les phénomènes de coagulation (Prabhakar, 2006). Un nombre croissant de travaux font également état de leur implication dans des processus pathologiques tels que les cancers (Sasisekharan, 2006), mais aussi les troubles neurodégénératifs tels que la maladie d'Alzheimer, ou les maladies à prions (Diaz-Nido, 2002).

D'un point de vue chimique, les GAGs sont des polymères glycaniques linéaires non ramifiés, constitués de répétitions d'unités disaccharidiques (fig 2). Le nombre de ces unités varie de 10 (dans le sulfate de kératine) à plus de 5000 (dans l'acide hyaluronique). Le plus souvent, ces unités sont constituées d'un sucre aminé et d'un acide uronique. Les GAGs se différencient par la nature de l'hexosamine et sont ainsi répartis en deux catégories : les galactosaminoglycannes (possédant une D-Galactosamine GalNAc) et les glucosaminoglycannes (possédant une D-Glucosamine GlcNAc). Les héparanes sulfates (HS) sont constitués d'un résidu acide glucuronique (GlcA) lié en $\beta(1-4)$ à un résidu N-acétylglucosamine (GlcNAc) ; les kératanes d'un résidu galactose lié en $\beta(1-4)$ à un résidu GlcNAc ; les chondroïtines d'un GlcA lié en $\beta(1-3)$ à un résidu N-acétylgalactosamine (GalNAc). La structure des dermatanes est très proche de celles des chondroïtines mais le résidu GlcA est remplacé par un acide iduronique (IdoA). Enfin, l'acide hyaluronique est constitué de la répétition d'une unité GlcA liée en $\beta(1-4)$ à un GlcNAc. La biosynthèse des GAGs de type HS ou chondroïtines sulfate/dermatanes sulfate (CS/DS) est un processus complexe qui implique un nombre important d'enzymes qui assemblent le polymère de GAG et lui greffent des groupements sulfate à des positions très précises (Sasisekharan, 2006).

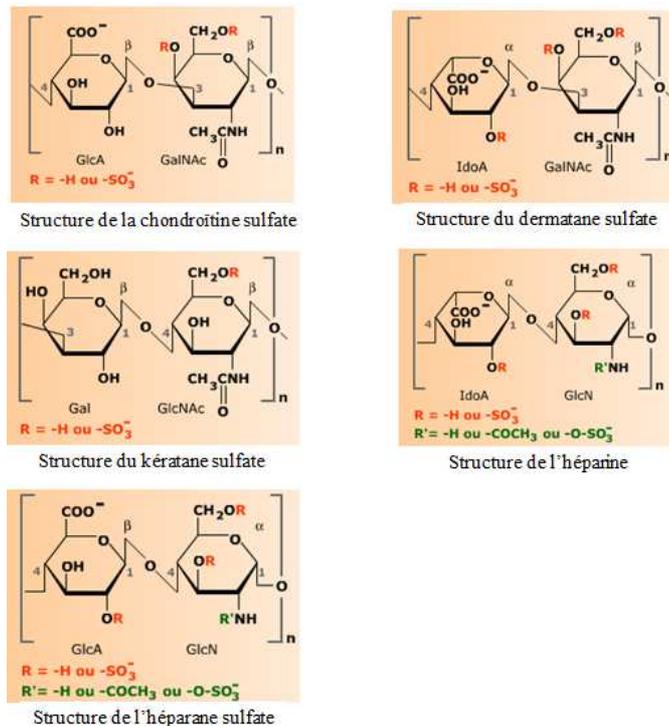


Figure 2 : Formules chimiques des unités disaccharidiques constitutives des différents GAGs.

Comme l'illustre la figure 2, chaque GAG porte des groupements sulfate SO_3^- en différentes positions, majoritairement sur des extrémités $-\text{OH}$ non réductrices. Cependant la présence des groupements sulfate n'est pas obligatoire, l'acide hyaluronique n'est pas sulfaté. Cependant ces groupements chimiques apportent des charges négatives aux GAGs qui deviennent des polyanions. Ce sont ces charges qui leur permettent d'interagir avec un grand nombre de ligands biologiques. La spécificité des interactions entre les GAGs et leurs ligands est due, au moins en partie, à la répartition fine de ces groupements sulfate le long de la chaîne de GAGs (Habuchi, 2004). Ces groupements sont greffés au cours de la synthèse des GAGs par des sulfotransférases (Kusche-Gullberg, 2003).

Dans la majorité des cas, les chaînes linéaires de GAGs (40 à 100 chaînes) sont liées à des protéines pour former une structure macromoléculaire : le protéoglycane (PG). Les protéoglycannes entrent dans la catégorie des O-glycosylprotéines. La proportion de glucides des protéoglycannes peut atteindre 95 %. Les protéoglycannes peuvent être soit transportés à l'extérieur de la cellule par exocytose s'intégrant alors à la matrice extracellulaire sous forme de chondroïtine-sulfate, kératane-sulfate, héparane-sulfate, dermatane-sulfate, soit entrer dans la constitution de la membrane plasmique ou du glycocalyx, jouant alors un rôle dans les relations cellule-matrice. Les PG sont les constituants majeurs de la MEC. Les héparanes sulfates (HS) et les chondroïtines / dermatanes sulfates (CS / DS) sont O-liées au cœur protéique du PG par l'intermédiaire d'un tétrasaccharide sur un résidu sérine (Gandhi, 2008). En revanche, les kératanes sulfates (KS) sont soit N-liés (cas des KS I, rencontrés

dans la cornée), soit O-liés (cas des KS II rencontrés dans les cartilages et KS III décrits dans le cerveau) au coeur protéique du PG.

4. Les sulfoglycolipides

Les glycolipides forment un groupe structurellement hétérogène de composés de la membrane trouvés chez de nombreux organismes de la bactérie à l'Homme. Une classification assez récente des principaux glycolipides a été réalisée en 1997 par l'Union Internationale de Chimie Fondamentale et Appliquée IUPAC (Chester, 1997). Cette classe de lipides inclut des types variés de longues chaînes de dérivés de sucre qui peuvent contenir le plus fréquemment une chaîne principale glycérol (diacylglycérol) chez les bactéries et les plantes et céramide chez les animaux. Beaucoup de ces glycolipides sont porteurs de décorations qui modifient leurs fonctions biologiques, notamment les glycolipides sulfatés. En fonction de leurs structures, les glycolipides sulfatés peuvent être classés en plusieurs groupes :

- Les sulfoglycoglycérolipides, basés sur le glycérol, sont trouvés chez les champignons, les algues, les bactéries, les chloroplastes des plantes supérieures, et aussi chez certaines cellules de mammifères. Notamment dans plusieurs tissus de mammifères (cerveau, spermatozoïdes) des esters de sulfate de galactoglycérolipides sont trouvés. Leur structure est donnée dans la figure 3, où les groupes acyles R' et R'' sont très souvent saturés (16 ou 18 atomes de carbone) (Kornblatt, 1972).

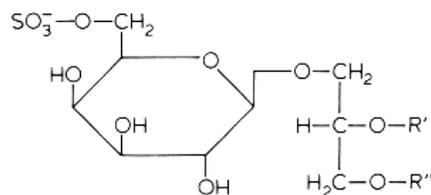


Figure 3 : structure d'un sulfoglycoglycérolipide ; R' et R'' sont des groupes acyles souvent saturés.

- Les sulfosphingolipides, basés sur des céramides, contiennent une partie céramide hydrophobe et une partie hydrophile qui consiste en une unité mono- ou oligosaccharidique liée au groupe hydroxyle en C-1 du céramide. Généralement le résidu terminal galactose est estérifié avec un sulfate sur le carbone C-3 (Farooqui, 1981). Quatre sulfosphingolipides majeurs sont retrouvés sur des tissus de mammifères :

Les cérébrosides 3-sulfate ou sulfatides sont des céramides sulfogalactosyle. La première preuve de l'existence de lipides contenant du soufre a été donnée par Thudichum en 1884 qui a isolé un lipide d'un cerveau humain et lui donna le nom de sulfatide. La première description complète de sa structure fut donnée en 1933 (Blix, 1933). Ce composé est formé à partir d'un cérébroside et d'une réaction catalysée par une sulfotransférase (fig 4).

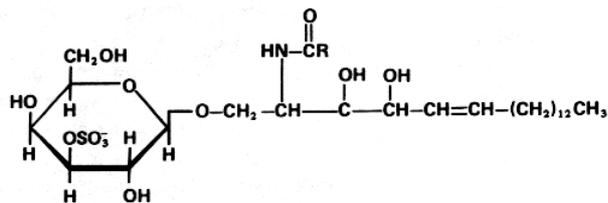


Figure 4 : structure d'un sulfatide

Les céramides dihexosyle sulfate sont des céramides sulfolactosyle. Un sulfatide avec deux parties hexose (glucose et galactose) a été isolé à partir de rein humain. Le groupe sulfate est estérifié, comme dans les sulfatides, avec le carbone 3 de la partie galactose. La liaison entre le galactose et le glucose est identique au lactose (β -1-4). Sa composition en acide gras est similaire à celle des sulfatides.

Le lipide sulfaté céramide trihexosyle sulfate a été découvert dans la muqueuse gastrique du porc (Slomiany, 1974). Le groupe oligosaccharidique est composé d'un résidu galactose et de deux glucoses. Le groupe sulfate est estérifié avec le carbone 3 du galactose. Les acides gras sont faiblement hydroxylés.

Le céramide tétrahexosyle sulfate est un sulfoglycosphingolipide, avec une chaîne d'oligosaccharide composée de quatre unités, et a été caractérisé comme le sulfoglycolipide majeur de l'intestin grêle de souris (Leffler, 1986). Sa formule globale peut être écrite comme suivant:



Les glycosides stéroïdes sulfatés, glycosides de stérol, ont été décrits chez l'étoile de mer (Prokof'eva, 2003). La caractéristique chimique la plus inhabituelle est la liaison à un composé diglycoside, avec une fraction glycoside xylopyranosyle et une autre méthyle xylopyranosyle (fig 5).

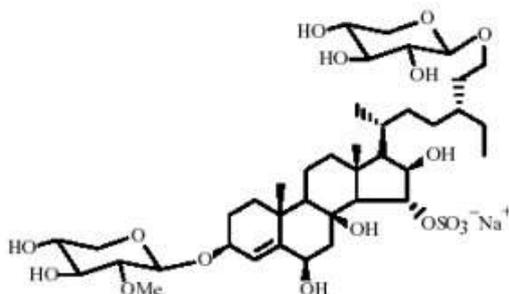


Figure 5 : structure d'un sulfo-glycoside stéroïde.

5. Les facteurs de nodulation

Un certain nombre de micro-organismes, à la fois pathogènes et symbiotiques, sont capables d'envahir des plantes hôtes et de profiter de cette niche écologique particulière. Ces interactions sont très spécifiques et un microbe donné ne peut infecter et se multiplier que dans un nombre limité d'hôtes. La symbiose *Rhizobium*-légumineuse est l'une de ces associations spécifiques dont la génétique est bien étudiée pour un certain nombre de partenaires bactériens (Long, 1989). Les gènes *nod* de *R. meliloti*, nécessaires pour la production de signaux émis par les bactéries en direction de la plante hôte cible, déterminent l'infection, la nodulation et la spécificité de l'hôte. Notamment les gènes communs *nodABC* sont impliqués dans la production par *R. meliloti* de facteurs Nod extracellulaires. L'analyse chimique de ces facteurs extracellulaires sécrétés par les bactéries *Rhizobium* a révélé que ces composés sont constitués de polymères de GlcNAc liés en β 1,4, qui sont N-acylés à l'extrémité non réductrice et N-acétylés sur les autres résidus (Lerouge, 1990 ; Roche, 1991-1). Étonnamment, les lipo-oligosaccharides sécrétés par *R. meliloti* sont uniques en étant O-sulfatés sur la position 6-OH de la partie terminale réductrice GlcNAc (Roche, 1991-2). La structure du signal principal, appelé NodRm-1, a été démontrée comme étant un tétramère sulfaté et acylé de glucosamine : β -GlcN(2,9-hexadecadienyle)-(1-4)- β -GlcNAc-(1-4)- β -GlcNAc-(1-4)-GlcNAc-6-SO₃H (fig 6). Un second signal, appelé Ac-NodRm-1, dérivé acétylé de Nod-Rm-1, a été identifié également.

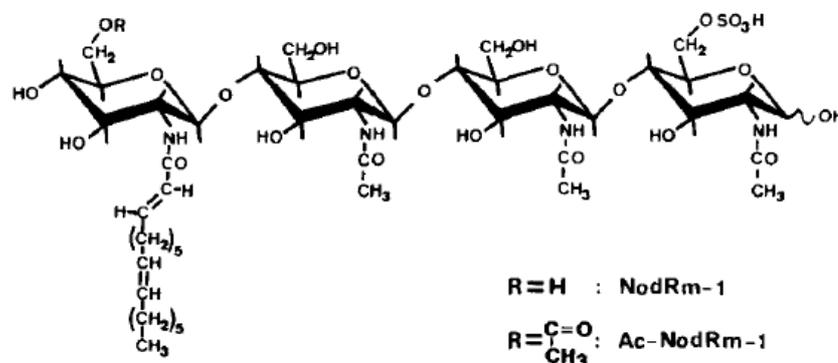


Figure 6 : Structures de NodRm-1 et Ac-NodRm-1(Roche, 1991)

6. Le HNK1

Dans le système nerveux, différents types de cellules se reconnaissent et interagissent entre elles pour former un réseau précis de neurones. Au cours de ces processus, les glycannes exprimés sur les protéines occasionnent la diversité structurelle des protéines de transport, entraînant une régulation de la reconnaissance, de l'interaction et de la migration des cellules. Parmi ces glycannes, le glycanne HNK-1 (human natural killer-1) est l'un des glyco-épitopes le plus caractéristique dans le système nerveux (Schachner, 1995). Le glycanne HNK-1 est présent sur certaines glycoprotéines et certains glycolipides biologiquement actifs dans le système immunitaire et dans le système nerveux, où il est impliqué dans de nombreux processus importants.

L'anticorps monoclonal désigné HNK-1 reconnaît un antigène (110 kDa) de lymphocyte humain présent sur approximativement 20% des cellules mononuclées du sang périphérique chez l'adulte. Cet anticorps HNK-1 définit le 1^{er} antigène spécifique exprimé uniquement sur les cellules NK et K humaines. Initialement développé pour être utilisé comme un outil de recherche de leucocyte, les recherches ont révélées également un potentiel de reconnaissance de cet anticorps de plusieurs cellules nerveuses, gliales, neuro-ectodermales et neuro-endocriniennes reconnues comme étant impliquées dans les interactions cellules-cellules. L'anticorps monoclonal HNK-1 reconnaît un épitope sucre spécifique commun à plusieurs molécules d'adhésion des cellules nerveuses de la super famille des immunoglobulines (Schmitz, 1994), qui comprennent les glycoprotéines transmembranaires (N-CAM, L1, Ng-CAM, Nr-CAM, TAG-1, F11/13, glycoprotéines associées à la myéline, MAG, OMgP, SAG, MOG, PMP-22) et les protéines de la matrice extracellulaire (J1, Intégrines, cellules épendymaires). Ainsi c'est donc bien l'épitope HNK-1 qui est considéré comme marqueur de ces molécules d'adhésion des cellules et semble impliqué dans de nombreux processus du système nerveux central et périphérique.

Dans le cas des glycolipides, il a été conclu que l'épitope HNK-1 est l'épitope reconnu par l'anticorps HNK-1.

Les structures complètes de certains glycolipides portant l'épitope HNK-1 ont été caractérisées. Dans les nerfs périphériques humains, ces glycolipides sont les 3-sulfoglucuronylneolactotetraosylceramide et 3-sulfoglucuronylneolactohexaosylceramide (Chou, 1996).

L'épitope HNK-1 contient au final un acide glucuronique 3 sulfaté, mais le corps principal de type néolactosyle semble aussi essentiel (Schmitz, 1994). La structure complète d'une glycoprotéine portant l'épitope HNK-1, issue d'une glycoprotéine de la myéline périphérique bovine P0, est caractérisée pour la 1^{ère} fois (Voshol, 1996). En comparant cette structure à celle des glycolipides, l'épitope HNK-1 est finalement caractérisé comme le SO₄-3GlcAβ(1-3)Galβ(1-4)GlcNAcβ- (fig 7)

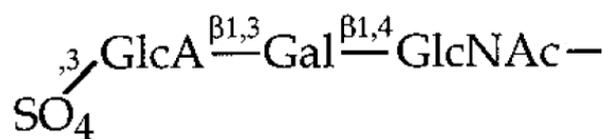


Figure 7 : structure de l'épitope oligosaccharidique HNK-1.

7. Les 6-sulfo sialyl Lewis x

Les leucocytes surveillent le corps de l'infection en recirculant en continu entre le sang, les tissus, et les ganglions lymphatiques. Dans les tissus lymphatiques, les veinules à endothélium haut (VEHs) sont les voies d'entrée de la plupart des cellules lymphocytaires B et T dans le ganglion lymphatique (par le mécanisme du *homing* des lymphocytes). Pendant le processus de recirculation des lymphocytes normaux, la L-sélectine exprimée sur les lymphocytes interagit avec un ensemble de ligands glycoprotéiques sulfatés exprimés sur les cellules endothéliales du VEH. Cette interaction conduit à un roulement des lymphocytes, qui constitue la première étape dans la cascade de recrutement qui aboutit à la migration des lymphocytes dans le tissu sous-jacent (Butcher, 1996). Les cellules endothéliales haute (CEH) du VEH dans les organes lymphoïdes qui se développent sur les sites de l'inflammation chronique sont connues depuis longtemps pour intégrer de grandes quantités de [³⁵S] sulfate dans plusieurs espèces (Girard, 1995). La signification fonctionnelle de cette sulfatation n'a pas été comprise jusqu'à ce que les ligands de la L-sélectine aient été élucidés. À ce jour, quatre ligands glycoprotéiques HEV-associés pour la L-sélectine ont été identifiés au niveau moléculaire : GlyCAM-1, CD34, MAdCAM-1 et la podocalyxine. Il est bien établi que la reconnaissance optimale de ces ligands par le domaine lectine de type C de la L-sélectine exige de la sialylation (Imai, 1991), de la fucosylation (Maly, 1996), et de la sulfatation (Imai, 1993). La sialylation et surtout la sulfatation ont été décrites comme essentielles aux fonctionnalités de ces ligands (Hemmerich 2, 1994).

Une analyse détaillée du motif GlyCAM-1 (molécule d'adhésion cellulaire glycosylée-1), dont l'expression tissulaire est restreinte, spécifiquement associée aux HEV, a permis de détecter deux monosaccharides sulfatés spécifiques: la N-acétyl-6-sulfate (GlcNAc-6-sulfate) et le galactose-6-sulfate (Gal-6-sulfate), qui étaient présents en quantités égales (Hemmerich, 1994-1; Hemmerich, 1994-3). Ces modifications du sulfate se trouvent, respectivement, dans les deux structures sur la base du sialyl Lewis x (SLe^x): le 6-sulfo sialyl Le^x et le 6'-sulfo sialyl Le^x (fig 8).

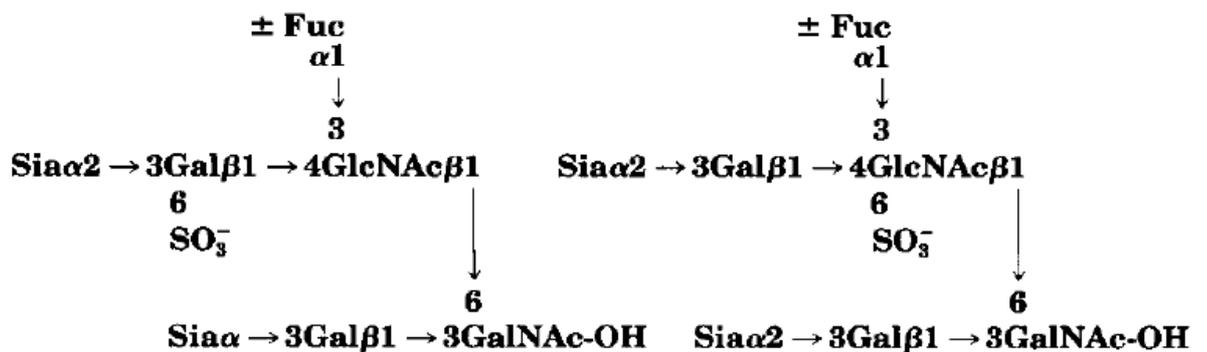


Figure 8 : structures du 6-sulfo sialyl Lewis x (à gauche), sulfaté en position 6 du galactose, et du 6'-sulfo sialyl Lewis x (à droite), sulfaté en position 6 du N-acétylglucosamine. Ce sont les deux épitopes primaires majeurs de reconnaissance du ligand GlyCAM-1 à la L-sélectine (Hemmerich, 1994)

La plus simple des chaînes de GlyCAM-1 se compose de 6'-sulfo sialyl Le^x et de 6-sulfo sialyl Le^x qui s'étendent à partir d'un trisaccharide interne connu sous le nom de base 2 (Gal1,3[GlcNAc1,6]GalNAc) (fig x). Des structures plus complexes avec une taille de chaîne plus importante et plusieurs esters sulfates constituent la majorité des chaînes et doivent encore être analysés en détail. Des anticorps anti-6'-sulfo-SLex se lient aux ligands exprimés sur la VEH, inhibant ainsi la liaison aux L-sélectines.

3. Les rôles biologiques des glycanes sulfatés

1. Rôle de l'hormone lutéinisante

L'un des premiers systèmes biologiques dans lesquels les glycanes sulfatés ont été présentés jouant un rôle crucial a été la participation de l'hormone lutéinisante (LH). LH est essentielle pour la régulation de nombreux processus physiologiques impliqués dans la reproduction, la maturation folliculaire, l'ovulation, et la sécrétion d'œstradiol et de progestérone. LH est synthétisée par les gonadotrophines du lobe antérieur de l'hypophyse et est stockée dans des granules de sécrétion avant la libération dans la circulation sanguine sous stimulation par l'hormone de relargage des gonadotrophines (Pierce, 1981). L'hormone est alors sécrétée par l'hypophyse dans la circulation sanguine, et exerce son effet physiologique en se liant et en stimulant des récepteurs à LH dans l'ovaire.

Un aspect unique de la biologie de LH est son apparition pulsatile dans la circulation sanguine. L'élévation et la chute épisodiques des taux de LH sont nécessaires à l'expression de sa bioactivité (Evans, 1992). Le récepteur à LH est un récepteur couplé à la protéine-G qui active l'adénylcyclase lors de la liaison de la LH. Comme d'autres membres de cette famille de récepteurs, le récepteur à LH est désensibilisé par la liaison du ligand. L'ascension et la chute des taux de LH dans la circulation peuvent donc être cruciales pour le maintien de la stimulation maximale des récepteurs à la LH dans l'ovaire, car la diminution du taux de LH dans la circulation entre les impulsions permet un remplacement des récepteurs désensibilisés par d'autres récepteurs inoccupés prêts pour un autre cycle de stimulation.

La base de l'élimination rapide de la LH de la circulation n'a pas été comprise avant l'élucidation du rôle joué par son motif oligosaccharidique N-lié (Baenzinger, 1992). La LH porte un motif oligosaccharide unique N-lié se terminant par la séquence SO₄-4GalNAc(β1,4)GlcNAc (Stockell-Hartree, 1992). L'influence de cette séquence terminale oligosaccharidique N-liée sur la demi-vie circulatoire de la LH est liée à l'aspect unique sulfaté en β1,4 du GalNAc de ce motif, contrairement à la grande majorité des glycoprotéines hypophysaires qui portent des oligosaccharides N-liés sialylés.

2. Rôle des glycosaminoglycannes

Selon leur localisation, les GAGs sont impliqués dans de nombreux processus biologiques. Les GAGs possèdent un grand nombre de sites de sulfatation possibles. Ces sulfatations sont hétérogènes et sont aussi à l'origine de leurs propriétés biologiques (Schaefer, 2009)

Associés aux PGs, les GAGs se trouvent de façon ubiquitaire au sein de l'organisme, aussi bien à la surface des cellules, dans la matrice extracellulaire ou encore à l'intérieur des cellules (principalement dans les granules de sécrétions). Ils sont synthétisés par tous types de cellules. Ainsi, ils sont impliqués dans la prolifération ou l'adhésion cellulaire ou encore dans la différenciation et la morphogénèse des tissus. On retrouve majoritairement des PG à motif DS dans les fibres de collagène (Parry, 1982), KS dans la cornée et le cartilage (Funderburgh, 2002), HS dans le système cardiovasculaire et dans le système nerveux central, et enfin les PG à motifs CS (CSPG), majoritairement représentés dans les cartilages et dans le système nerveux. Un récapitulatif des structures, des localisations et des implications biologiques des différents GAGs est montré dans le tableau 2.

GAGs	Localisation	Implications biologiques
Galactosaminoglycannes		
Sulfate de Chondroïtine (CS)	Cartilage, os, derme, cornée, paroi artérielle	paludisme, rhumatologie, croissance neuronale
Sulfate de Dermatan (DS)	derme, ligament, cartilage	coagulation, thrombose
Glucosaminoglycannes		
Héparine	foie, poumon, aorte	coagulation, thrombose
Sulfate d'Héparane (HS)	Foie, poumon, aorte	facteur de croissance, reconnaissance cellulaire
Acide Hyaluronique (AH)	cartilage, derme	Cosmétologie (hydratation), angiogénèse, rhumatologie
Autres		
Sulfate de Kératane (KS)	cartilage, cornée	Inconnue

Tableau 2 : Structures, localisations et fonctions des glycosaminoglycannes

La fonction physiologique la mieux connue des glycosaminoglycannes est l'effet anticoagulant de l'héparine sécrétée par les mastocytes, et de l'héparane sulfate présent à la surface des vaisseaux. Les facteurs de croissance de la famille des FGF (Fibroblast Growth Factors), ainsi que plusieurs autres facteurs de croissance, se lient avec avidité à l'héparane sulfate de la matrice extracellulaire. Il y a des preuves que cette liaison piège et concentre les facteurs de croissance à la surface de la cellule, là où se trouvent les récepteurs adéquats.

Des récepteurs à CSA (4-sulfate) seraient impliqués dans le paludisme. Dans le cartilage du genou, 80% des GAGs sont des CS et leur destruction conduit à des cas d'arthrose grave. Les CSPG sont les GAGs les plus abondants dans la MEC du système nerveux central (Purushothaman, 2007) et se lient à d'autres molécules comme la laminine, la fibronectine, la tenascine, l'acide hyaluronique ou le

collagène (Galtrey, 2007). Ces interactions dictent l'organisation de la matrice du système nerveux central. Chez l'adulte, des travaux ont permis de mettre en évidence un rôle des CSPG dans le contrôle de la plasticité matricielle en jouant des rôles dans le maintien de l'architecture tissulaire et dans la maturation des synapses des motoneurons (Rhodes, 2004). Au cours du développement, les CSPG agissent comme des molécules de guidage des axones (Snow, 1990).

Les HSPG se lient à des facteurs de croissance, à des protéines morphogènes, des composants de la MEC, des molécules d'adhésion cellulaire, ou encore des facteurs de guidage des axones et a un rôle certain dans l'architecture des tissus (Van Vactor, 2006). Présentes à de nombreux stades du développement, des anomalies de la synthèse des HSPG vont donc provoquer des anomalies de morphogénèse, qui peuvent être à l'origine de multiples maladies. Notamment les HSPG sont impliqués dans certaines maladies neurodégénératives conformationnelles. L'agrégation de l' α -synucléine sous forme de fibrilles, qui pourrait être un élément à l'origine de la maladie de Parkinson, est influencée par des interactions à l'agrin, un protéoglycane à motif HS présent dans le système nerveux central (Li, 2001). Le perlecan est le HSPG le plus abondant dans les lésions cérébrales liées à la maladie d'Alzheimer (Snow, 1989).

Les chaînes de KS ont récemment été décrites dans le cerveau, dans une configuration particulière appelée KS-III (Funderburgh, 2002). Dans cet organe, les KS sont connus pour être des inhibiteurs de la croissance des axones (Jones, 2002). Au cours du développement, leur localisation spatio-temporelle est donc réduite à des zones où la croissance axonale est faible. Par exemple, au cours du développement du rat, les KS sont présents au niveau du tube neural à partir de 12,5 jours pendant 24 heures maximum. C'est le laps de temps pendant lequel les neurones accroissent leurs axones (Snow, 1990). Chez l'adulte, ils sont présents au sein de la microglie, et sont impliqués dans la réponse à un traumatisme.

D'après Habuchi et al (2004) il semble que la sulfatation des GAGs soit un élément clef de la régulation d'un certain nombre de processus physiologiques, développementaux et pathologiques. Les auteurs proposent même l'existence d'un « code de sulfatation » nécessitant une régulation fine et une répartition précise des groupements sulfate le long des chaînes de GAG. D'autres travaux apportent des éléments en faveur de l'existence de ce code de sulfatation (Ben-Zaken, 2003). En effet, ils mettent en évidence des profils de sulfatation particuliers au sein des chaînes d'HS nécessaires à leur interaction avec la protéine prion, par l'intermédiaire de régions hyper sulfatées, encadrées par des régions moyennement sulfatées, elles-mêmes flanquées de régions non-sulfatées. De plus, ces régions protégeraient les GAGs vis-à-vis de certaines enzymes de dégradation, aboutissant à des chaînes de GAGs de longueurs différentes (Ben-Zaken, 2003). Des altérations du code de sulfatation seraient à l'origine de graves pathologies. En effet un certain nombre d'organismes mutants présentant des

défauts pour diverses sulfotransférases ont été produits. Ils mettent en évidence un rôle critique de la sulfatation des GAGs dont des altérations conduisent à de graves pathologies ou problèmes de développement (tab 3). Par exemple, des phénotypes sévères ont été observés chez la souris dont la sulfatation des héparanes en position 2 du résidu GlcNAc ne se fait pas : ces souris présentent une agénésie totale des reins (Bullock, 1998).

GAGs impliqués	Espèce	Enzyme ou gène touché(e)	Activité enzymatique	Phénotype
HS	Souris	NDST-1	N-déacétylation et N-sulfatation de GlcNAc	Létal à la naissance, atelectasie pulmonaire, cyanose
		NDST-2	N-déacétylation et N-sulfatation de GlcNAc	Déficiência dans la synthèse de l'héparine dans les cellules mastocytaires
		C5-épimerase	Conversion de GlcA en IdoA dans les HS	Létal à la naissance, agénésie rénale, malformations pulmonaires
		HS2ST	2-O sulfatation de la glucosamine des HS	Létal à la naissance, agénésie rénale
		HS3ST-1	3-O sulfatation de la glucosamine des HS	Létal post-natal, retard de croissance <i>in utero</i> , coagulation normale
		EXT-1	HS copolymérase	Létal au niveau embryonnaire : défaut de la gastrulation
	Drosophile	<i>Sulfateless</i>	N-déacétylation et N-sulfatation de GlcNAc	Segmentation anormale
		<i>Tout velu</i>	HS copolymérase	Segmentation anormale
	<i>C. elegans</i>	<i>Rib-2</i>	HS copolymérase	Défaut de la gastrulation : les gènes à effets maternel ont une action létale
		<i>Hse-5</i>	Conversion de GlcA en IdoA dans les HS	Mauvais développement des axones
<i>Hst-2</i>		2-O sulfatation de la glucosamine des HS	Mauvais développement des axones	
<i>Hst-6</i>		6-O sulfatation de la glucosamine des HS	Mauvais développement des axones	
CS	Souris	C6ST	6-O sulfatation de GalNAc des CS	Réduction de la quantité de lymphocytes T dans la rate
	<i>C. elegans</i>	<i>Sqv-5</i>	Chondroïtine synthase	Défaut de morphogénèse vulvaire et de cytokinésie

Tableau 3 : Organismes mutants qui présentent des défauts dans la biosynthèse ou la sulfatation des GAGs (Habuchi, 2004).

3. Rôle des sulfoglycolipides

Dans les testicules et le cerveau, les sulfoglycoglycérolipides se composent d'un mélange de alkylacycle (séminolipides) et de diacyleglycérol. Ces composés pourraient être associés dans le système nerveux avec le processus de myélinisation (Pieringer, 1977). Des preuves ont été fournies que les séminolipides sont essentiels à une spermatogenèse normale chez les souris (Fujimoto, 2000).

Les sulfatides sont des constituants majeurs des lipides du cerveau alors qu'on les trouve à l'état de traces dans d'autres tissus. Curieusement, les sulfatides sont présents dans les tissus qui sont très actifs dans le transport de sodium (glandes à sel, branchies). Les sulfatides se trouvent aussi dans les reins et la rétine. Il s'agit de glycosphingolipides essentiels dans le sang périphérique ainsi que le système nerveux central, constituant 4-6% en mole du total des lipides de la myéline du cerveau adulte. Les sulfatides modulent divers processus biologiques comme la régulation de la croissance cellulaire, le trafic des protéines, la transduction du signal, l'adhésion cellulaire, la plasticité neuronale et la morphogenèse (Ishizuka 1997). La sulfotransférase des sulfatides est très active pendant le processus de myélinisation, mais le turnover du groupe sulfate est extrêmement lent. Des expériences sur des souris dépourvues de sulfotransférase ont démontré que les sulfatides sont nécessaires pour la myélinisation et la dégénérescence neuronale dans la prévention, des anomalies dans les jonctions paranodales (Honke, 2002), et dans l'entretien des canaux ioniques (Ishibashi, 2002). L'analyse des tissus du cerveau humain démontre qu'une diminution marquée de sulfatides est associée à la pathologie de la maladie d'Alzheimer même chez les sujets atteints de démence très douce, ces changements peuvent être liés à des événements qui interviennent tôt dans le processus pathologique (Han, 2002). Dans les autres tissus, les sulfatides se sont avérés être environ trois fois plus concentrés dans les reins des mammifères marins que dans ceux de leurs proches parents terrestres (Nagai, 2008). Ces différences laissent supposer que ces composés acides peuvent contribuer au maintien de l'équilibre osmotique de leurs fluides corporels contre l'eau de mer.

4. Rôle des facteurs de nodulation

Les bactéries fixatrices d'azote du sol du genre *Rhizobium* ont la capacité d'établir une association symbiotique avec la cosse de plantes comme la luzerne, la vesce, le pois, et les lentilles. Dans cette interaction, les bactéries provoquent chez la plante le développement d'un nouvel organe, le nœud de nodulation, dans lequel le micro-organisme réside et réduit l'azote atmosphérique en ammonium. Cette association symbiotique est très spécifique: une souche donnée de *Rhizobium* suscite la nodulation d'une seule plante hôte.

Dans le cas de *R. meliloti*, cette sélectivité d'accueil est déterminée par la capacité de cette souche de bactéries fixatrices d'azote de synthétiser un lipo-oligosaccharide spécifique sulfaté. La plante hôte possède la totalité du programme génétique pour l'organogenèse nodulaire; le rôle du

symbiote est de commuter sur ce programme. Le processus de nodulation nécessite donc des contributions à la fois des gènes des bactéries et de l'hôte.

Certains des gènes bactériens impliqués dans ce processus sont structurellement et fonctionnellement conservés dans toutes les espèces *Rhizobium* indépendamment de la spécificité de l'hôte. Ces gènes sont connus sous le nom gènes *nod* et inclus les gènes *nodABC* (Ehrhardt, 1995). En outre, il y a des gènes *nod* spécifiques de l'espèce qui déterminent la spécificité ou la gamme d'hôte d'une souche particulière de *Rhizobium*. Il s'agit notamment des gènes *nodH* chez *R. meliloti*, qui induisent normalement la formation de nodules de la luzerne, mais pas dans d'autres légumineuses hôtes comme le soja et la vesce (Schultze, 1995). En effet, ces gènes *nod* bactériens spécifiques des espèces dirigent la synthèse de facteurs extracellulaires sécrétés. Lorsqu'ils sont purifiés, ils ne suscitent des réactions physiologiques associées à la nodulation que chez la luzerne, pas dans vesce ou le pois. Ceci indique que ces facteurs sécrétés constituent la base de la spécificité de l'hôte des souches de *Rhizobium*. En même temps qu'ils perdent leur capacité à produire des lipooligosaccharides sulfatés, des mutants sont également incapables de susciter des formations de nodules chez l'hôte normal (Roche, 1991). Toutefois, ils acquièrent la capacité d'induire la nodulation chez un autre hôte. Ainsi, il existe une corrélation frappante entre la production de facteurs Nod sulfatés chez *R. meliloti* et la spécificité de l'infection et la nodulation de l'hôte.

5. Rôle du HNK-1

L'épitope HNK-1 est présent dans tout le règne animal. Chez l'homme adulte, les anticorps HNK-1 réagissent avec des sous-ensembles de lymphocytes granuleux du sang périphérique et des ganglions lymphatiques (Abo, 1981). Tout comme chez les autres mammifères, l'épitope HNK-1 est grandement distribué dans le système nerveux, notamment au niveau de la gaine de myéline (McGarry, 1983). Dans le système nerveux central, il est localisé à la surface de nombreuses cellules gliales, à la surface des oligodendrocytes, à la surface luminale des cellules épendymaires et sur des cellules périneurales. La plupart des cellules nerveuses n'expriment pas cet antigène (Gebhart, 1983). En addition, l'anticorps HNK-1 reconnaît plusieurs cellules neuroectodermique et neuroendocriniennes, comme celles trouvées dans le pancréas, l'intestin, la moelle surrénale et l'hypophyse antérieure.

Dans le cerveau de rat plusieurs molécules ont été montrées portant l'épitope HNK-1 en divers endroits et à différents temps selon un programme développemental strict (Chou, 1991 ; Nordlander, 1993). L'épitope HNK-1 est spatialement et temporellement limité aux processus développementaux spécifiques, et est donc suspecté d'avoir une fonction intégrale dans ces processus.

La plupart des études concernant la fonction de l'épitope HNK-1 sont effectués sur le système nerveux (Schachner, 1995). L'épitope HNK-1 est un puissant ligand qui augmente l'adhésion des

cellules nerveuses à la laminine de la matrice extracellulaire (Hall, 1993), il est impliqué également dans l'adhésion astrocytes-neurones et astrocytes-astrocytes (Keilhauer, 1985). L'épitope HNK-1 participerait à la sélection des substrats des cellules nerveuses et gliales (Vogel 1993).

La mise au point fine des interactions cellulaires lors de la régénération nerveuse et lors du développement ontogénétique, en ce qui concerne la sélection des cibles spécifiques du réseau neuronal en régénération est un point important d'une régénération réussie. Le réglage fin des interactions entre les cellules est contrôlé en partie par le glycane HNK-1 qui est sélectivement exprimé par les cellules de Schwann myélinisées qui sont associées à des axones moteurs, mais pas par celles qui sont associées avec les axones sensoriels (Martini, 1992). La croissance des neurites de neurones moteurs *in vitro* est renforcée en présence d'un substrat uniforme qui contient le HNK-1 dans la forme glycolipidique, alors que la croissance des neurites de neurones sensoriels n'est pas affectée. Cette expression très spécifique de HNK-1 est une « prédisposition prévoyante » pour la réinnervation spécifique des axones moteurs des cibles initiales, les muscles et contribue à la guidance de la régénération des axones après une lésion des nerfs moteurs.

HNK-1 est porté par plusieurs molécules de reconnaissance neuronales dans le cerveau de souris adulte, y compris par L1, MAG, par les molécules d'adhérence cellulaire des cellules nerveuses (NCAM), et les tenascines. HNK-1 est détectable dans la myéline compacte, dans la lame basale et à la surface cellulaire des cellules de Schwann ; ce sont les sites que les axones moteur suivent lors de la repousse après des lésions nerveuses périphériques (Löw, 1994).

L'épitope HNK-1 est lié à la consolidation de la mémoire chez les poissons. Des anticorps contre l'épitope HNK-1 et contre des épendymes (une glycoprotéine sécrétée qui porte l'épitope HNK-1) injectés intraventriculairement, causent une diminution de la consolidation de la mémoire (Schmidt, 1998).

L'épitope HNK-1 est vital pour la migration des cellules de la crête neurale fœtale chez de nombreuses espèces (Bronner-fraser, 1987). Il est fréquemment utilisé comme un marqueur de ces cellules durant le développement embryonnaire (Bronner-fraser 1986).

Chez l'Homme, l'application d'un peptide mimique du glycane HNK-1 sur un nerf fémoral blessé améliore préférentiellement la réinnervation des nerfs moteurs (Simova, 2006).

En outre, son expression est corrélée positivement à certains types de cancer comme le cancer du rein et des mélanomes (Cassano, 2008 ; Allory, 2005).

Enfin, les neuropathies auto-immunes peuvent être associées à la présence d'anticorps HNK-1 (Baumann, 2000).

Toutes les fonctions de l'épitope HNK-1 ne sont pas constructives. Il a été prouvé qu'il avait un rôle dans le processus d'attachement initial des cytomégavirus (Ogawa-goto, 1998). Il a été reporté qu'un anticorps monoclonal de l'épitope HNK-1 permet de réduire de 20-25% la remyélinisation chez des souris infectées par le virus avec de nombreuses scléroses (Asakura, 1998).

6. Rôle du 6'sulfo sialyl Lewis x.

A partir d'études de deux anticorps monoclonaux, MECA-79 et G72, le déterminant 6'sulfo sialyl Lewis x (Su-SLe^x) a été décrit comme le ligand le plus important pour la L-sélectine sur des veinules à endothélium épais de ganglions lymphatiques périphériques humains (Hemmerich 1, 1994), permettant ainsi l'extravasation des lymphocytes dans le tissu sous-jacent lors d'inflammation chronique ou aigue. Lors de l'étude de sa distribution dans les tissus de cancer colorectaux chez l'homme et dans des cultures de cellules du cancer du côlon, le déterminant 6'sulfo sialyl Lewis X a été préférentiellement exprimé dans l'épithélium colonique bénin plutôt que dans les cellules cancéreuses (Izawa, 2000). Les sialyl Lewis x conventionnels sont au contraire préférentiellement exprimés dans les tissus cancéreux plutôt que dans les épithéliums bénins, indiquant que la sulfatation en C-6 de la position GlcNAc est renforcée dans les tissus non malins et est supprimée lors de la transformation en cellules malignes dans le cancer du côlon. Ces résultats montrent également que les déterminants 6-sulfatés ont tendance à être plus préférentiellement localisés dans les épithéliums bénins que les déterminants 3'-sulfatés. La signification physiologique du 6-sulfo sialyl Le^x dans les tissus coloniques n'est pas définie. Il est proposé que le déterminant classique sialyl Le^x exprimé dans les cellules cancéreuses du côlon joue un rôle important dans les métastases hématogènes par le biais de la liaison aux E-sélectines sur les vaisseaux sanguins. Le déterminant 6'-sulfo sialyl Le^x exprimé faiblement dans les cellules cancéreuses pourrait également jouer un rôle dans l'adhésion. Une fonction possible proposée des déterminants glucidiques sulfatés dans l'épithélium normal est l'absorption de micro-organismes pathogènes tels que les virus ou les bactéries, et ce pourrait être une fonction physiologique du 6-sulfo sialyl Le^x exprimé sur l'épithélium bénin du côlon.

Récemment, une étude réalisée sur le virus Influenza de type A a permis de démontrer que plusieurs lignées indépendantes du virus de la grippe de la volaille diffèrent de leurs précurseurs chez les oiseaux aquatiques par un renforcement de la liaison au 6'-sulfo sialyl Lewis X (Gambaryan, 2008). De plus, cette spécificité de liaison est accompagnée par la capacité du virus à se fixer au récepteur de type humain 6'SLN. L'adaptation au récepteur de Su-Slex chez les volailles terrestres pourrait renforcer le potentiel d'un virus aviaire à se transmettre à l'homme et à propager la pandémie.

Dans une autre étude, il a été montré que le 6'sulfo sialyl Lewis X joue un rôle essentiel dans la pathogenèse de la gastrite chronique active et dans la protection de la muqueuse gastrique contre *Helicobacter pylori*. Le développement de nouvelles thérapies à base de glucides ou la prévention contre l'infection de *H. pylori* peuvent être envisagés.

II. Les sulfotransférases

La sulfatation est une modification essentielle des protéines, des glucides et des lipides qui contrôle de nombreux processus biologiques. Chez les animaux, la sulfatation est catalysée par une myriade de sulfotransférases qui transfèrent le sulfate sur une grande variété de biomolécules. Les molécules sulfatées participent à de très nombreux processus cellulaires comme l'embryogenèse, l'inflammation, les voies de signalisation, la coagulation du sang, le développement du cerveau, le trafic des leucocytes et le métabolisme des médicaments, ainsi que lors des états physiopathologiques comme le cancer et des pathogénies bactériennes.

La sulfatation décrite pour la première fois par Baumann en 1876, a été depuis signalée comme étant une voie importante de la biotransformation de nombreux xéno- et endobiotiques tels que les médicaments, les produits chimiques cancérigènes, les hormones, les acides biliaires, les neurotransmetteurs, les peptides et les lipides. Le donneur universel de sulfate utilisé lors de ces réactions est le 3'-phosphoadénosine 5'-phosphosulfate (PAPS), et le transfert de sulfate (SO_3^-) vers un groupe hydroxyle ou amino- est catalysé par une super famille de gènes d'enzymes appelées les sulfotransférases STs (CE 2.8.2.-). Cette réaction, souvent appelée transfert de sulfuryle, sulfatation, ou sulfonation, est une caractéristique largement observée depuis le monde bactérien jusqu'à l'Homme.

L'importance du PAPS dans la régulation de la sulfatation a été soigneusement examinée (Klaassen, 1997; Schwartz, 2005). En général, le mécanisme enzymatique global requiert l'accepteur sulfate (ROH) et le donneur (PAPS) pour se lier à une sulfotransférase, qui aboutit à la formation du produit sulfaté et du 3'-phosphoadénosine-5'-phosphate (PAP). Les STs sont capables de sulfater une large gamme de substrats, car ces enzymes existent sous de multiples formes et que les sites de liaison de certaines isoformes sont malléables, permettant à l'enzyme d'adopter différentes architectures. Une étude des différentes STs a été réalisée ici en fonction de leur origine, de leur famille, de leur spécificité de substrat et de leur mode d'action.

1. Les sulfotransférases eucaryotes

Depuis les années 80, près d'une centaine de STs d'eucaryotes ont été clonées. Des études, réalisées à partir de leurs séquences d'acides aminés, ont démontré qu'il existait deux classes distinctes de STs eucaryotes, présentant très peu d'homologie entre elles dans la séquence d'acide aminé, mais appartenant pourtant toutes les deux à la même famille d'enzyme. Ces deux classes de sulfotransférases sont: (1) les sulfotransférases cytosoliques (appelé SULT) qui sulfatent les molécules de petite taille et qui sont responsables du métabolisme des xénobiotiques et des petits substrats endogènes comme les hormones, les amines, les stéroïdes, les acides biliaires, et les neurotransmetteurs. (2) les sulfotransférases associées à la membrane (également appelé Golgi-

résident) qui se trouvent dans l'appareil de Golgi de la cellule et qui sont responsables de la sulfatation de gros substrats dans la voie de sécrétion, comme les peptides, les protéines, les lipides et les glycosaminoglycanes, affectant à la fois de leurs caractéristiques structurales et fonctionnelles (Falany, 1997; Negishi, 2001.)

Un nouvel élan concernant l'étude structurale de ces enzymes a été réalisé en 1997 par Nose et Lipmann (Nose, 1997). L'EST de souris (mEST), complexé avec la forme inactive du donneur sulfate 3'-phosphoadénosine-5'-phosphate (PAP) est devenue la première structure cristalline aux rayons X résolue pour la famille des STs. Cette structure a révélé que le site de liaison au PAPS est profondément enfoui dans la poche hydrophobique de l'enzyme. Par la suite, d'autres structures cristallines de STs cytosoliques et membranaires ont été réalisées.

Les STs sont des protéines globulaires composées d'un seul domaine α/β avec un feuillet- β caractéristique à cinq brins. Le feuillet- β constitue le site de liaison au PAPS et le cœur du site catalytique, les deux étant conservés dans les STs cytosoliques ou membranaires (Kakuta, 1999). Les études de ces STs, en complexe avec le PAPS ou avec son dérivé non sulfaté PAP, révèlent une conservation du site de liaison du cofacteur suggérant que toutes les STs eucaryotes ont des mécanismes catalytiques d'action similaires. Les résidus d'acides aminés impliqués dans l'interaction avec les groupes 5'phosphosulfate ou 3'-phosphate du PAPS ont été identifiés (fig 9).

consensus sequence		PKTGTTLW RS SSF			IYVLRNPKDRLVSYIH TIV D REVA R Y L			
	Start	5' PSB			Start	3' PB		
Cytosolic								
moEST	47	DLVIATY	PKSGTTWI	SEVVYMIY (-71-)	126	CKM	IYLCRNAKDVAVSYYY	FLLM
moPST	50	DVLISTY	PKSGTNWM	SEIMDMIY (-71-)	127	IKV	IYVARNAKDVVVSYYN	FYKM
moHST	43	DLILITY	PKSGTNWL	NEIVCLIQ (-71-)	115	AKA	IYLMRNPRDILVSGYF	FWGN
rbAST	45	DVFEVITY	PKSGTVWT	QQILSLIY (-67-)	119	AKI	IYVYRNPKDVLISFFH	FSNM
FST	58	DVFLASY	PKSGTTWL	KALAFAT (-71-)	135	CKI	VYIYRNMKDVIYSYIH	FLRQ
NodH	17	PFAILAM	PRTGTHYL	EVLLNEHP (-84-)	109	KVI	LVVRRNILESRLSLVQ	ARQS
Golgi-associated								
raHSND/NST	613	KLLIIGP	QKTGTTAL	YLFLGMHP (-79-)	700	AKV	LTILINPADRAYSWYQ	HQRA
chCS6ST	121	HVLLMAT	TRTGSSFV	GEFFNQOG (-148-)	277	LRI	IQLVRDPRAVLVSRMV	AFSG
huGalCerST	84	NIVFLKT	HKTASSTL	LNILFRFG (-68-)	160	AIF	ITVLRDPARLFESSFH	YFGP
haHS2OST	82	VIIYNRV	PKTASTSF	TNIAYDLC (-80-)	160	PIY	INVIRDPIERLVSYYY	FLRF
huHS3OST	63	QTIIIGV	RKGGTRAL	LEMLSLHP (-72-)	143	IRL	LLILRDPSEVLSDYT	QVEY
huKSGal6ST	69	HILILAT	TRSGSSFV	GQLFNQHL (-153-)	230	LKV	IQLVRDPRGILASRSE	TFRD
huHS6OST	85	VIVFLHI	QKTGTTTF	GRHLVQNV (-78-)	171	FYV	ITLLRDPVSRYLSEWR	HVQR
huHNK-1ST	127	KILFCQT	PKVGNTQW	KKVLIVLN (-50-)	185	YFK	FFIVRDPFERLISAFK	DKEV
moGlcNAc6ST	126	LVYVFTT	WRSGSSFF	GELGFNQN (-147-)	281	LKV	IHLVRDPRAVASSRIR	SRHG
huTPST	78	LIFIGGV	PRSGTTLM	RAMLDAHP (-94-)	180	AKF	IIMVRDGRASVHSMIS	RKVT
moLSST	50	HVLVLSS	WRSGSSFV	GQLFGQHP (-142-)	200	LHV	VHLVRDPRAVFRSREH	TTIE
SD	81	VVLYNRV	PKTGSTSF	VNIAYDLC (-70-)	159	PIY	INLVRKPLDRLVSYYY	FLRF

Figure 9 : comparaison des séquences d'acide aminé des sulfotransférases. (Kakuta, 1999)

Ces études révèlent qu'un résidu arginine ou lysine est partagé par toutes les STs dans le site de liaison au 5'-phosphosulfate (5'-PSB) et qu'un résidu arginine est partagé par toutes les STs dans le motif de liaison au 3'-phosphate (3'-PB). De plus, un résidu sérine entièrement conservé de la boucle du 3'-PB crée un lien hydrogène avec le groupe hydroxyle du 3'-phosphate. Les structures cristallines des rayons X ont ouvert une nouvelle ère pour l'étude des sulfotransférases.

En contraste avec la bonne conservation du site de liaison au PAPS et du domaine catalytique dans toutes les STs eucaryotes, le site de liaison au substrat est totalement différent chez les enzymes membranaires et cytosoliques.

Le site de liaison d'une ST membranaire présente une fente grande ouverte avec une surface hydrophile, alors que le site de liaison du substrat dans les STs cytosoliques est une profonde poche hydrophobe. Ces différences structurelles sont compatibles avec la liaison de substrats chimiques et structuraux uniques de ces enzymes. Le site d'action catalytique de chaque ST peut accueillir divers substrats, et l'étude des complexes formés par la ST avec ses substrats permet de mieux comprendre la spécificité de substrat qu'il existe au sein des différentes sulfotransférases.

Une ST donnée catalyse une sulfatation très spécifique d'un polysaccharide dans notre cas. C'est pourquoi il est extrêmement important de connaître la spécificité de substrat des enzymes que l'on souhaite utiliser car seule une sulfatation spécifique peut produire la molécule unique désirée, essentielle pour l'action souhaitée à étudier.

Plusieurs familles de sulfotransférases eucaryotes ont été identifiées et définies en fonction de leurs spécificités de substrats accepteurs et du type de transfert de sulfate qu'elles catalysent. Ces STs sont résumées ci-dessous :

- carbohydre sulfotransférase des glycanes: CHST1, CHST2, CHST3, CHST4, CHST5, CHST6, CHST7, CHST8, CHST9, CHST10, CHST11, CHST12, CHST13, CHST14
- galactose-3-O-sulfotransférase: GAL3ST1, GAL3ST2, GAL3ST3, GAL3ST4
- héparane sulfate 2-O-sulfotransférase: HS2ST1,
- héparane sulfate 3-O-sulfotransférase: HS3ST1, HS3ST2, HS3ST3A1, HS3ST3A2, HS3ST3B1, HS3ST3B2, HS3ST4, HS3ST5, HS3ST6
- héparane sulfate 6-O-sulfotransférase: HS6ST1, HS6ST2, HS6ST3
- N-déacétylase/N-sulfotransférase: NDST1, NDST2, NDST3, NDST4
- tyrosylprotéine sulfotransférase: TPST1, TPST2
- uronyl-2-sulfotransférase: UST
- Estrone sulfotransférase
- Chondroïtine 4-sulfotransférase
- Les SULFs humaines: SULT1A1, SULT1A2, SULT1A3, SULT1A4, SULT1B1, SULT1C2, SULT1C3, SULT1C4, SULT1D1P, SULT1E1, SULT2A1, SULT2B1, SULT4A1, SULT6B1

1. Les STs cytosoliques eucaryotes ou SULFs

Depuis les années 1980, au moins 47 isoformes de STs cytosoliques de mammifères, une isoforme d'insecte, et huit enzymes d'origine végétale, qui représentent neuf familles séparées de SULFs et 14 sous-familles, ont été clonées et caractérisées (Blanchard, 2004). Jusque-là la nomenclature des SULTs était encore une source de confusion. Un système de nomenclature des sulfotransférases cytosoliques de mammifères a été conçu sur la base de similarité de séquence, des variants alléliques, et des isoformes (Blanchard, 2004).

Actuellement, 13 SULTs humaines ont été identifiées et classées en 4 familles, SULT1, SULT2, SULT4, et SULT6 (Lindsay, 2008 ; Blanchard, 2004). Celles-ci peuvent être divisées ainsi : SULT1-A1, A2, A3, A4, B1, C2, C4, E1; SULT2-A1 et B1 (SULT2B1_v1 et SULT2B1_v2); SULT4A1 (SULT4A1_v1 et SULT4A1_v2) (tab x). La famille SULT3 a été trouvée uniquement chez la souris et le lapin, et sulfate principalement les groupes amino. La structure de la première sulfotransférase végétale (*Arabidopsis thaliana*) a été récemment rapportée (Smith, 2004), révélant qu'elle est plus semblable aux sulfotransférases humaines SULT1E1 et SULT2A1. Un récapitulatif des différents sulfotransférases cytosoliques humaines est donné dans le tableau 4.

SULT	Chromosomal location		Name given by author	Accession No.
SULT1A1	16p11.2-12.1	cDNA	P-PST-1	L19999
			HAST1	L10819
			ST1A3	X78283
			P-PST	X84654
			H-PST	U26309
		Gene	HAST2	L19955
				U09031
			SULT1A1	NM_001055
			SULT1A1	AJ007418
			STP1	U71086
SULT1A2	16p11.2-12.1	cDNA	STP	U54701
			TS- PST1 (STP1)	U52852
			ST1A2	X78282
			HAST4v	U28169
			HAST4	U28170
		Gene	STP2	U76619
				U34804
				U33886
				L19956
				L19957
SULT1A3	16p11.2	cDNA	HAST3	L19956
			HAST3-intron1	L19957
			TL- PST	U08032
			hEST	L25275
			m-PST	X84653
		Gene	hm-PST	-
			STM	U20499
			HAST	U37686
				L34160
				MGC5178
SULT1A4	16p12.1	cDNA	SULT1A4	D89479
SULT1B1	4q11-13	Gene	SULT1A4	U95726
		cDNA	ST1B2	AF184894
SULT1C4	2q11.2	Gene	SULT1B2	AF184894
		cDNA	hSULT1C	AF055584
SULT1E1	4q13.1	Gene	SULT1C2	AF186263
		cDNA	hEST (STE)	U08098
SULT2A1	19q13.3	cDNA	hEST-1	S77383
			SULT1E1	Y11195
			STE	U20514-21
			DHEA-ST	U08024
				U08025
		Gene	hSTa	S43859
				L02337
			DHEA-ST8	X70222
			STD	U13056-61
				L36191-196
SULT2B1_v1	19q13.3	cDNA	hSULT2B1a	U92314
		hSULT2B1b	U92315	
SULT4A1_v1	22q13.1-13.2	Gene	SULT2B1	U92316-22
SULT4a1_v2		cDNA	hBR-STL	AF188698
			hSULT4A1	AF251263
			SULTX3	AF115311
	Gene	SULT4A1	AJH28171	
			Z97055	

Tableau 4 : ADNc et gènes de la superfamille des STs cytosoliques humaines (Gamage, 2006)

2. Les STs membranaires eucaryotes

Les connaissances sur les structures des STs Golgi-résidents sont moins avancées. Ce sont des protéines membranaires type II à travée unique, avec une courte queue cytoplasmique N-terminale et un domaine catalytique C-terminal localisé dans la lumière du Golgi. Une région de longueur variable, appelée région de la tige, est située entre la séquence transmembranaire et le domaine catalytique. On sait très peu sur l'organisation des enzymes dans le compartiment du Golgi, mais elles sont susceptibles de former des complexes avec d'autres enzymes dans la même voie de biosynthèse.

Seulement deux structures d'enzymes Golgi-résidents sont disponibles et sont toutes les deux des STs d'héparane sulfate. La structure cristalline du domaine de la ST d'héparane sulfate double fonction N-désacétylase-N-ST (NDST-1) complexé avec le PAP a été la première structure ST d'héparane à être déterminée (Pikas, 2000). Le domaine ST pour cette enzyme Golgi-résident a été identifié par sa similitude avec les séquences de l'EST, ce qui permet la cristallisation d'un fragment actif contenant le domaine ST. Plus récemment, la structure cristalline de l'héparane sulfate murine-3-O-ST isoforme-1 (3OST-1) complexé avec le PAP a été résolu (O'Donnell, 2010).

Malgré le peu de connaissance sur les structures des STs membranaires, leurs activités ont été grandement étudiées, notamment dans le domaine de la glycobiochimie qui nous intéresse. En effet seule les STs membranaires sont capables de sulfater des motifs oligosaccharidiques. Plusieurs groupes importants de STs membranaires peuvent être distingués en fonction de la spécificité de substrat et du type de liaison du groupe sulfate apportées par ces STs.

Une étude un peu plus détaillée des STs membranaires impliquées dans les synthèses de glycanes sulfatés d'intérêt que nous allons étudier dans le cadre de l'usine cellulaire, est faite ici.

a) *GalNAc-4-sulfotransférase*

La spécificité de la présence du terminal 4S-GalNAc- sur l'oligosaccharide N-lié de l'hormone lutéinisante LH est apportée par la N-acétylgalactosaminyl-4-sulfotransférase (GalNAc-4-sulfotransférase). Cette enzyme est exprimée dans l'hypophyse et transfère le sulfate depuis le donneur PAPS à l'extrémité GalNAc liée en β 1,4. Cette sulfotransférase est spécifique des oligosaccharides portant le disaccharide terminal GalNAc β 1,4GlcNAc, et ne reconnaît pas les glycanes se terminant par un Gal (Hooper, 1995). De plus, cette transférase ajoute du sulfate exclusivement sur le 4-OH du terminal GalNAc. La GalNAc-4-sulfotransférase possède un K_m apparent de 30 μ M pour le disaccharide terminal GalNAc β 1,4GlcNAc (Hooper, 1995).

La protéine a été identifiée comme ayant une topologie de membrane de type II, et le domaine transmembranaire (résidus 5-22, en pointillé sur la fig. 10) est flanqué d'acides aminés basiques. Cette topologie est également retrouvée dans toutes les glycosyltransférases de mammifères. La séquence d'acides aminés des résidus 187 à 195 (séquence double soulignée sur la fig 10 et la fig 11) présente une homologie avec les séquences trouvées dans les autres sulfotransférases associées au Golgi comme la 6-O-sulfotransférase de sulfate de chondroïtine de poulet (*chCho6ST*), la sulfotransférase des galactocéramides humaine (*huGalCer-ST*), la 2-O-sulfotransférase de sulfate d'héparane de hamster (*haHep2ST*) ou la 3-O-sulfotransférase de sulfate d'héparane humaine (*hu3-OST*). En particulier, la séquence RDP (résidus 189 à 191) est totalement conservée et les acides aminés hydrophobiques sont partagés par toutes les séquences d'acides aminés de ces ST's (fig 11).

huHNK-1ST	187-IV RDP FERL-195
raHNK-1ST	187-IV RDP FERL-195
haHep2ST	162-VI RDP IERL-170
chCho6ST	279-LV RDP RAVL-287
huGalCerST	162-VL RDP ARLF-170
hu3-OST	145-IL RDP SERV-153
hu3-OST	220-LI RDP FPEI-228
consensus	xxRDPzzzX

Figure 11 : comparaison des séquences d'acides aminés de sulfotransférases (Ong, 1998)

La séquence d'acides aminés de la HNK-1ST du rat (voir ci-dessus) est également reportée et présente la même séquence que la HNK-1ST humaine pour ces résidus 187 à 195. Cette comparaison permet de déterminer une séquence consensus (x représente un acide aminé hydrophobe et z un acide aminé quelconque), présente chez la plupart des STs de la membrane du Golgi. Cette séquence consensus pourrait être impliquée dans la liaison au PAPS ou dans la catalyse. Toutefois cette séquence consensus est différente des séquences présumées de liaison au PAPS chez les STs cytosoliques (Weinshilboum, 1997). Trois sites de N-glycosylations potentielles ont été identifiés (marqués par un astérisque sur la fig 10) ainsi qu'une séquence consensus de signal de polyadénylation (résidus 2432 à 2437) suivie par une queue poly(A). Les études montrent qu'il existe deux régions dans le domaine catalytique qui sont partagées par toutes les STs (Kakuta, 1998) : 5'-PSB et 3'-PB, impliquées dans la liaison au PAPS. A partir de mutations réalisées au niveau de ces deux sites, il a été montré que les résidus Arg¹⁸⁹, Pro¹⁹¹ et Ser¹⁹⁷ sont importants pour la liaison au donneur PAPS ou pour maintenir la conformation de l'enzyme active. Les résidus Lys¹²⁸ et Asp¹⁹⁰ seraient plus impliqués dans la liaison à l'accepteur que dans la liaison au substrat donneur.

La HNK-1ST humaine est plus facilement accessible pour des accepteurs N-glycannes que pour des O-glycannes dans des glycoprotéines comme les NCAM (Ong, 1999) .

Une HNK-1ST chimérique soluble est formée à partir d'un fragment de protéine encodant la région du stem et le domaine catalytique de la HNK-1ST en fusion avec un fragment de protéine

encodant une séquence d'un peptide signal et le domaine de liaison IgG de la protéine A de *Staphylococcus aureus* (protéine de fusion A-HNK-1ST) (Kizuka, 2006). Cette protéine de fusion est capable *in vitro* de sulfater des glycoprotéines et des glycolipides, notamment un précurseur GlcAβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-octyl en position du carbone C-3 de la N-acétyllactosamine pour former un conjugué sulfo-3GlcAβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-R. Cela démontre que l'ADNc utilisé et étudié est capable d'encoder la HNK-1ST humaine.

Concernant la distribution dans les tissus, les études démontrent que cette HNK-1ST humaine est hautement distribuée dans le cerveau, en totale adéquation avec le fait qu'elle soit responsable de la formation du glycanne HNK-1 dans les tissus nerveux.

En parallèle, une autre équipe a cloné et étudié une HNK-1ST issue de *Rattus norvegicus* cette fois (Bakker, 1997). Comme vu précédemment, la séquence d'acide aminé de cette HNK-1ST de rat présente 90.2% d'homologie de séquence avec celle de la HNK-1ST humaine, ce qui laisse supposer que les deux ADNc utilisés encodent la même enzyme. L'ADNc cloné de 2649 paires de base, issu du cortex cérébral de rat, code pour une protéine de 356 acides aminés (fig 12).

```

GGTGGGCTCGGGTGGGCGGGCTCTTGACACCCGGGAGCTCGCACGTAACCCAGTTTCCCTCTTCGGAGTGSGCTGCACCTAGGCCACCCAGCGGGCCGGCGGGCTAGCGGCGGGAGG 120
TCTGGGCGGGGGCGGGCTCCCGGGCTCGGGGACGCCACAGGCCCTGCGAGGGCAGAGCAGAGCGCGGGCGGGGGAAGAGCGCGAGCGCCGGGGACCGGAGGGAAGGATCATCGGAT 240
GGACCCCTGTTTGACAACATGCACCACCCAGTGGCTCCTGCTGGCTGCATGCTTTTGGTGATTTTCATGTTTCATGGTGCCAGCAAGTTCATCACGTTGACCTTCAAAGACCCGGATGGGT 360
M H H Q W L L L A A C F W V I F M F M Y A S K F I T L T F K D P D G
ATAGTCCAAACAGGAGTTTGTGTTCTGACGGCCATGCCAGAAGCAGAGAAGCTAAGAGGAGAGAAGCATTTTCTGAAGTCATGAAGCCAACCTGGGAAGATGCTTTCGGAGAGCCATC 480
Y S A K Q E F V F L T A M P E A E K L R G E K H F S E V H K P T G K H L S E S H
CTGATCAGCCCCGGTTTATCTGGAGCGGCTGGAGCTCATCAGAAACGCTTGCAAGGAGGAGGCTCTGCGGAACCTCTCCACACCCAGGCTCTCAAGTTTGTCTGGATCGAATCTTTG 600
P D Q P P V Y L E R L E L I R N A C K E E A L R N L S H T E V S K F V L D R I F
TCTGTGACAAGCACAAGATCTTTTCTGTGACACCCCAAAGTGGGCAACACCCAGTGGAAAGAAAGTGCTGATCGCTTAAATGGAGCATTTCCTTATTGAAGAGATCCCAGAAAACG 720
V C D K H K I L F C O T P K V G N T O W K K V L I V L N G A F S S I E E I P E N
TGTTTCATGACCATGAGAAAATGGCCCTCCACGCTCTCTTCCCTTCAGCAAAATAGGAATTCAGAAAGCATTGAAAACATACTTCAAGTTTTTATTGTGAGGGATCCCTTTGAAAAGAC 840
V V H D H E K N G L P R L S S F S K I G I Q K R L K T Y F K F F I V R D P F E R
TGATCTGCTGCTTAAAGGATAAGTTTGTTCACAATCTCGATTGAAACCTTGGTACAGGCACGAGATAGCCCGGGCATTATTAGGAAATACCGGAAAGAACCCGGACAGAGACCCGGGGTA 960
L I S A F K D K F V H N P R F E P W Y R H E I A P G I I R K Y R K N R T E T R G
TCCAGTTTGAAGATTTTGTGCGCTACCTGGGTGATCCAAACCCAGGTTGGTAGACCTTCAAGTTTGGGGACCATATATCCACTGSGGTGACCTACGTAANAACCTGTGACCCCTGTGAGA 1080
I Q F E D F V R Y L G D P N R R W L D L Q F G D H I I H W V T Y V K L C A P C E
TAAAGTACAGTGTGATGGACACCAGGAGACCTGGAGGCGAGATGCCCGTACATCTAAAAGAAGTGCCATTGACCCACCTGGTGTGATACCCACTATCCCTCCCGGCATCACCATGT 1200
I K Y S V I G H H E T L E A D A P Y I L K E A G I D H L V S Y P T I P P G I T M
ACAACAGGACCAAGSTGGAGCAGTACTTCTGGGCATCAGCAAAACGAGACATCCGGCGTCTCTATGACCGTTTTGAAAGGGGACTTCAAGCTCTTTGGGTATCAGAAAACAGATTTTTTGC 1320
Y N R T K V E Q Y F L G I S K R D I R R L Y A R F E G D F K L F G Y Q K P D F L
TAAATTAAGGCATCAGACTCCTGAATATTGCTAGTTCCGGGGATGGCTAGGTGGAGATGTGAGAATCGGACCTTACCCTGTCCATGGTTCCGTGCATGGATGATGTTGGGCGCTGA 1440
L N
TTACCTGCTTTCACCTCGGGTGACAAATGCTCTGATGACTCCCTCCCGAGCTGTGTCACCCCAAGGTTAGGAAAGACTGGACGTGTGCAGACAGGTAAGACAGACCCAGAGGAGCC 1560
TGCCTTCAACTGTCACATTTGCTTGGTCTGTGTCAGCTTGCCTGATGCGGGTGTGTCACCCATGACCTGTGGACTGCACAGACCCAGCGCTTTCAGAGAGATGGGATACG 1680
AACGGCTGCAAAGGTTACTGGGCGCCATGCAGAGTGAATCTAAGCCAGAAATGATACCTTCTTCCATTTTGACACTAGCCACAGATCAGTCACTTCTGAGCTTGAGCCCTGTGAC 1800
ACTGGGTGGTGAATCAGAGAACAATCTGGAAGCTCTGATCTTTCGGACCCAGGCTAGCTCTTTTTCCGGACCTTGACCCCAAGTACCTGCTTAAATTCGACAGAGAGATCCCT 1920
TCTGGAAGTGAAGGCAATATCAGAACATCTGACGACCTAGAACTTGGCATGGGCAAGGAGGAACCGGCTCTGGGAACCTTGGGTGCACCGTTGTCTGACACCTGCTTTTGT 2040
CTTCGACGGCCCCAAGGAGCGAGCAGCAGGGGGCTTTCCACCTCTCTCTGAAACGACCTCCCTGTCTGAGAGGGGAGAGAAGACAAGCATTTCCGGTGGACAGAGACCGGCAT 2160
GCCGACGTGCCGTGATACGCACAGGCGTGCAGTGCCTGCATTCGCGAGTCCAGTGTCTGTGACAGACTGTCAAGTCCGTTTCATGTCGGCAGACGGGATCTTACGGTCTGAACTAATA 2280
GTGCCACTGTCTCGACTGAAAGACCCGCAAGTTGGATAATCAGATTTCGTCAGCAATAAAATCTGGGTGAGGCGGCCCTCCGGTGTGTCGCCCCAGGTGACAAGTCACTAACBTGGCA 2400
CTGAGGCCAGCCCCAGCAAGAAAGCCACAGCAGCTGTACAGCTGCCAACAGCAGCAAGGGTTATTAAGATGGAGGGACAGTTTTTCTGAGTAAGTCCCTGGCACATGCATCTGCC 2520
TGGGTTGAGAGGAATGTGCCAGTTTTTCTGAGGTTGACAGCCCTACTCTCAAAAAGCCTTCTTGAAGTGTAAATGTGAAAGTAAAAATAAAATTTAAATGTGTGCCAAAAAAA 2640
AAAAAAA 2649

```

Figure 12 : séquence complète des nucléotides et des acides aminés traduits de l'ADNc de la HNK-1-sulfotransférase de rat (Bakker, 1997).

Cette protéine est probablement une protéine membranaire de type II de part une région transmembranaire observée en partie N-terminale (partie soulignée), et son activité enzymatique est localisée dans le réticulum endoplasmique ou dans la lumière du Golgi. Elle possède des sites de N-

glycosylation potentiels (en astérisques). Une activité sulfotransférase GlcA-dépendante est encore une fois démontrée *in vitro* notamment sur des accepteurs glycolipidiques et glycoprotéiques. L'activité sulfotransférase d'une protéine de fusion, dans laquelle le domaine putatif cytoplasmique et membranaire de la HNK-1ST ont été remplacés par la protéine A précédée d'un peptide signal, est deux fois supérieure à celle de la HNK-1ST ancrée dans la membrane.

En considérant le fait que la biosynthèse du glycanne HNK-1 dans le système nerveux nécessite une activité conjointe d'une glucuronyltransférase (GlcAT-P ou GlcAT-S) et de la HNK-1-sulfotransférase, il a été démontré une interaction entre ces deux enzymes conduisant à une biosynthèse séquentielle et efficace du glycanne HNK-1 (Kizuka, 2006). Cette interaction a lieu au travers du domaine catalytique de GlcAT-P ou de GlcAT-S de rat et du domaine catalytique de la HNK-1ST de rat ou humaine. Cette interaction protéine-protéine permet une augmentation de l'activité enzymatique de la HNK-1ST *in vitro* mais ne modifie pas la spécificité de substrat des GlcA-transférases. Le mécanisme physiologique de cette interaction n'est pas connu. Néanmoins en s'appuyant sur le fait que d'autres hétérocomplexes de GTs sont impliqués dans des biosynthèses de glycolipides et ont été étudiés, il serait intéressant de cloner une ou plusieurs protéines de fusion entre la GlcAT et la HNK-1ST et de vérifier leurs différences d'activité enzymatique sur divers substrats.

c) *GlcNAc-6ST*

La L-sélectine, située sur les lymphocytes, joue un rôle clé dans leur fixation initiale sur les VEHS des ganglions lymphatiques. Un ligand de la L-sélectine dans les VEHS des ganglions lymphatiques est le GlyCAM-1, dont la sulfatation a été jugée nécessaire pour sa fonction. GlyCAM-1 dispose de deux structures N-sulfatées acétyllactosamine, le 6'-sulfo sialyl Lewis X et 6-sulfo sialyl Lewis X, dont la première est la structure principale (fig 13).

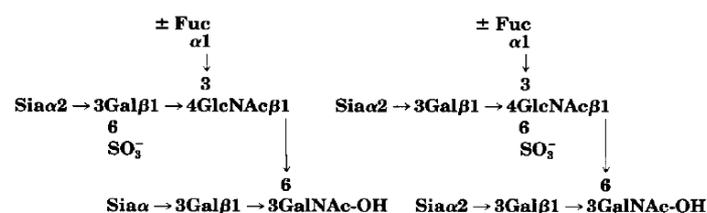


Figure 13 : structures du 6-sulfo sialyl Lewis x (à gauche), sulfaté en position 6 du galactose, et du 6'-sulfo sialyl Lewis x (à droite), sulfaté en position 6 du N-acétylglucosamine. Ce sont les deux épitopes primaires majeurs de reconnaissance du ligand GlyCAM-1 à la L-sélectine (Hemmerich, 1994)

Il y a actuellement sept membres de la famille des Gal/GalNAc/GlcNAc-6-O-sulfotransférases (GSTs): GST-0, -1, -2, -3, -4 β , -4 α , et -5. Les GSTs peuvent être divisées en deux sous-familles, les GalNAc/Gal-6-O-sulfotransférases et les GlcNAc-6-O-sulfotransférases. Les N-acétylglucosamine-6-O-sulfotransférase (GlcNAc6ST) catalysent le transfert de sulfate du PAPS en position 6 du résidu N-

acétylglucosamine non réducteur. Cinq GlcNAc6STs golgiennes ont été identifiées chez l'Homme (Grunwell, 2002). Leurs préférences de substrat sont différentes (tab 5).

name	nomenclature in literature	previous abbreviations	ref	accession no.	sulfated substrate
GST-0	chondroïtin 6-O-sulfotransférase	C6ST	99	AB012192	Gal,GalNAc
GST-1	keratan sulfate 6-O-sulfotransférase chondroïtin 6-O-sulfotransférase carbohydre sulfotransférase-1	CH6ST-1	103		GluA β 1,4-GalNAc
		KSGal6ST	106	AB003791	Gal β 1,4-GlcAc
		C6ST	108	U65637	
GST-2	N-acétylglucosamine 6-O-sulfotransférase carbohydre sulfotransférase-2	CHST-1	109	AF090137	
		GlcNAc6ST-1	110	AB014680	terminal GlcNAc
GST-3	HEC-restricted N-acétylglucosamine 6-O-sulfotransférase	CHST-2	109	AF83066	
		HEC-GlcNAc6ST			
GST-4 α	intestinal N-acétylglucosamine 6-O-sulfotransférase	GlcNAc6ST-2	81	AF131235	terminal GlcNAc
		I-GlcNAc6ST			
GST-4 β	corneal N-acétylglucosamine 6-O-sulfotransférase	GlcNAc6ST-3	111	AF176838	terminal GlcNAc
		C-GlcNAc6ST	102	AF219990	terminal GlcNAc
GST-5	chondroïtin 6-O-sulfotransférase-2	GlcNAc6ST-5	116	AF280086	
		C6ST-2	112	AB037187	(GluA β 1,4GalNAc)
			114	AF280089	terminal GlcNAc
		GlcNAc6ST-4	113	AB014680	GlcNAc β 1,6- ManOMe

Tableau 5 : Nomenclature et spécificité de substrat des sept GalNAc/Gal/GlcNAc-6-O-sulfotransférases (GSTs) golgiennes humaines clonées (Grunwell, 2002).

Parmi celles-ci, GlcNAc6ST-2, GlcNAc6ST-3 et GlcNAc6ST-5 sont très spécifiques, alors que GlcNAc6ST-1 (Uchimura, 1998-1) et GlcNAc6ST-4 (Uchimura, 2000) sont plus largement exprimées.

Un ADNc codant une N-acétyl-6-O-sulfotransférase a été cloné sur la base d'homologie de séquence avec la chondroïtine-6-sulfotransférase de souris précédemment cloné (Uchimura, 1998). L'enzyme exprimée transfère le sulfate en position 6 du GlcNAc non réducteur de GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc, mais pas au résidu GlcNAc contenu dans Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc. Cette enzyme reconnaît donc un terminal GlcNAc, et la 6-O-sulfatation GlcNAc semble précéder la galactosylation au cours de la biosynthèse du glycanne.

L'ADNc contient un cadre de lecture qui prédit une protéine transmembranaire de type II constituée de 483 acides aminés. L'expression de l'ADNc dans des cellules COS-7 a entraîné la production d'un antigène de surface cellulaire dont l'épitope a été caractérisé comme le NeuAc α 2-

3Gal β 1-4 (SO₄-6) GlcNAc; La transfection double avec la fucosyltransférase IV a donné l'antigène Gal β 1-4 (Fuc α 1-3)-(SO₄-6)-GlcNAc.

Ces résultats ont ainsi suggéré que la sulfotransférase est impliquée dans la biosynthèse des glycoconjugués portant la structure 6-sulfo N-acétyllactosamine tels que le 6-sulfo sialyl-N-acétyllactosamine et le 6'-sulfo sialyl Lewis X.

Un ADNc humain de GlcNAc6ST a été cloné (Uchimura, 1998-2). Le gène de la GlcNAc6ST-1 a été localisé sur le chromosome humain 7q31. La séquence prédite d'acides aminés de l'enzyme humaine de la GlcNAc6ST est hautement homologue avec celle de l'enzyme de la souris. En effet, bien que les régions correspondant aux régions tige soient faiblement homologues, parmi les 363 acides aminés de la région catalytique, les deux protéines sont clairement identiques (99% d'homologie). Seuls le changement de 3 résidus d'acides aminés est à noter, mais ceux-ci restent conservatifs.

L'ADNc humain cloné, encodant pour une protéine avec une courte queue cytoplasmique, a été transfecté dans des cellules COS-7. L'enzyme exprimée transfère du sulfate sur un motif GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc.

La co-transfection de l'ADNc avec la fucosyltransférase VII dans des cellules COS-7 résulte dans l'expression en surface cellulaire de 6'-sulfo sialyl LewisX.

Une autre équipe a cloné la GlcNAc6ST-2 (ou HEC-GlcNAc6ST ou CHST4 ou GST3 ou I-GlcNAc-6ST) (De Graffenried, 2003). GlcNAc6ST-2 est une bonne candidate pour la biosynthèse de ligand de la L-sélectine en raison de son expression très restreinte dans les VEHs. GlcNAc6ST-2 a une activité de sulfatation soutenue sur les glycoprotéines O-liées et peut agir sur les glycoprotéines N-liées dans une moindre mesure. L'analyse des souris "knockout" pour la GlcNAc6ST-2 identifie clairement cette enzyme en tant que participante dans la biosynthèse des sulfoadhésines et la biosynthèse de 6'-sulfo-sialyl LewisX.

Trois GlcNAc6STs humaines, nommément GlcNAc6ST-1, GlcNAc6ST-2 (HEC-GlcNAc6ST), et GlcNAc6ST-3 (I-GlcNAc6ST), ont été produites comme des protéines de fusion avec la protéine A, et leurs spécificités de substrat ainsi que leurs propriétés enzymologiques ont été déterminées (Uchimura, 2002).

Acceptor	Enzyme activity ^a pmol/h/ml of medium (%) ^b		
	GlcNAc6ST-1	GlcNAc6ST-2	GlcNAc6ST-3
GlcNAc β 1-6ManOMe	20.6 (100)	6.8 (100)	N.D. ^c
GlcNAc β 1-2Man	26.3 (128)	10.3 (151)	N.D. ^c
GlcNAc β 1-6[Gal β 1-3]GalNAc-pNP (core 2)	39.3 (191)	9.9 (145)	5.7 ^d
GlcNAc β 1-3GalNAc-pNP (core 3)	N.D. ^c	12.5 (184)	N.D. ^c
GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc	4.3 ^d (21)	5.0 ^d (73)	N.D. ^c

Tableau 6 : Comparaison des spécificités de substrat de la GlcNAc6ST-1, de la GlcNAc6ST-2 et de la GlcNAc6ST-3 sécrétées dans le milieu de culture par des cellules COS-7 transfectées (Uchimura, 2002).

Les deux GlcNAc6ST-1 et GlcNAc6ST-2 sulfatent efficacement les structures oligosaccharide suivantes : GlcNAc β 1-6[Gal β 1-3]GalNAc-pNP (corps 2), GlcNAc β 1-6ManOMe, et GlcNAc β 1-2Man. Les ratios des activités de ces substrats ne sont pas significativement différents entre les deux enzymes. Toutefois, GlcNAc-6ST-2, mais pas GlcNAc6ST-1, a agi sur le corps 3 de la GlcNAc- β 1-3GalNAc-pNP. La capacité de GlcNAc6ST-1 et de GlcNAc6ST-2 à sulfater une structure de corps 2 aussi efficacement renforce l'idée qu'elles sont impliquées dans la synthèse du sialyl-6-sulfo-Lewis-X, une structure clé des ligands de la L-sélectine.

2. Les sulfotransférases procaryotes

Il existe également des glycanes sulfatés dans le monde procaryote, et par conséquent des sulfotransférases sont également exprimées par les organismes procaryotes.

1. Rv1373

Les glycolipides tréhalose sulfatés sont parmi les molécules les plus caractéristiques de la paroi cellulaire des souches virulentes de *Mycobacterium tuberculosis* et sont responsables de la virulence de la souche. Une sulfotransférase impliquée dans la biosynthèse des sulfolipides présents à la surface des souches de *M.tuberculosis* a été identifiée (Riveira-marrero, 2002). Une recherche des séquences de gènes de ST chez *M.tuberculosis* a révélé le gène *Rv1373*, un gène de 981 paires de base légèrement homologue (24% d'identité) avec les arylsulfotransférases eucaryotes (fig 14).

```

Rv1373                               MNSEHPMTDRVVYR 14
hST                                MDGPAEPQIPGLWDTYEDDISEISQKLPGEYFRYKGVFPVGLY 44

Rv1373  SLMADNLRWDALQLRDGDIIISAPSKSGLTWTQRLVSLLVFDGPD---LPGPLSTVSPWL 71
hST     SL + +L + +RD DI I KSG TW ++ L++ +G P+ +PW
        SLESISLAENTQDVRDDDDIFIITYPKSGTWTMIEIICLILKEGDPSWIRSVPIWERAPVC 104
        Region I

Rv1373  DQITIRPIEEVVATLDAQQHRRFIKTHTPLD---GLVLDDRVSYICVGRDPRDAAVSMLYQ 128
hST     + + +L Q R + +H P+ + I +GR+PRD VS+ +
        ETIVGAF-----SLPDQYSPRLMSSHLPIQIFTKAFFSSKAKVIYMGPNRDRVVVSLYHY 159

Rv1373  SANMNEDEMRILHEAVVPFHERIAPPFAELGHARSPTTEEFRDWMEGPNQPPPQIGFTHLK 188
hST     S +IA + G +P + RD+++G Q G F H+K
        S-----KIAGQLKDPG---TPDQFLRDLFLKGEVQ--FGSUFDHK 194

Rv1373  GIGTLANILHQLGTWVVR-RHLPNVALPHYADYQADLAGELLRPARVLGIAATRDRARDL 247
hST     G W+R + N Y + Q DL G + R LG ++ +
        G-----WLRMKGKDNFLFITYEELQDQLQGSVERICGFLGRPLGKEALGSV 240

Rv1373  AQYATLDAMR----SRASEIAPNTTDGIWHSDEFRFRGGSGDWQQFFTEAE 295
hST     ++T AM+ S + + P+ D H F R+G GDW+ FT A+
        VAHSTFSAMKANTMSNYTLLPPSLLD---HRRGAFLRKGVCGDWKNHFTVAQ 289
        Region IV

Rv1373  HLYYHRINQLAPPDLLAWAHEGRRGYDPAN 326
hST     SEAFDRAYRKQMRGMPTFPWDEDPEEDGSPDPEPSPEPEPKPSLEPNTSLEREPRNPS
        SPSPGQASETTPHPRS 365

```

Figure 14 : comparaison des séquences d'acides aminés de Rv1373 de *M.tuberculosis* et de la sulfotransférase d'hydroxystéroïde humaine SUL2B1b (U92315) (Rivera-Marrero, 2002).

Le gène *Rv1373* de *M.tuberculosis* contient les régions des séquences I et IV hautement conservées, qui sont impliquées dans la liaison au PAPS et au transfert du sulfate.

Le gène *Rv1373* a été cloné par PCR, et la ST encodée est exprimée chez *E.coli* comme une protéine recombinante de fusion (39 kDa). Les souches de *E.coli* recombinantes ont une activité envers les glycolipides cérébrosides eucaryotes glucosyl- et galactosylcéramides. Aucune activité n'a été détectée avec le sulfatide galactosylcéramide 3'-sulfate suggérant que la sulfatation du galactosylcéramide peut avoir lieu en position C-3 du galactose.

Ces résultats démontrent que le gène *rv1373* encode une nouvelle sulfotransférase qui est cytosolique, elle montre des similarités avec les aryl-ST cytosoliques eucaryotes mais pas avec les STs des glycolipides et elle est active envers les glycolipides cérébrosides. Il existe peu de STs de glycolipides procaryotes, hormis *NodH* qui encode une ST qui catalyse la sulfatation des lipochitooligosaccharides chez *R.meliloti* (Ehrhardt, 1995), et leurs rôles sont peu connus. Maitriser une expression de *Hv1373* est une des étapes importantes pour la compréhension du rôle biologique des sulfolipides dans la virulence de *M.tuberculosis*.

2. GlcNAc-6-sulfotransférase

Lors de la symbiose établie entre les plantes légumineuses et les bactéries du sol *Rhizobium*, les gènes de la nodulation bactérienne (*nod*, *nol*), induits par les flavonoïdes de la plante hôte, sont impliqués dans la synthèse et l'excrétion de lipochitooligosaccharides de signal (facteurs Nod). Les facteurs Nod sont des déterminants majeurs de la spécificité de l'hôte. Au cours de la symbiose réalisée par la bactérie *R.meliloti*, le lipo-oligosaccharide sulfaté spécifique a été identifié (fig 15).

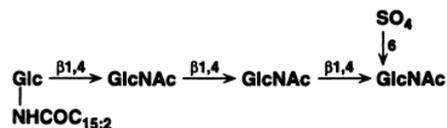


Figure 15 : Structure du facteur de nodulation de *Rhizobium meliloti*.

La synthèse de ce glycanne sulfaté nécessite la présence chez *R.meliloti* d'une sulfotransférase spécifique qui catalyse le transfert du sulfate en position 6 du résidu N-acétylglucosamine en partie réductrice. Cette ST est encodée par le gène *nodH* de *R.meliloti* (Schultze, 1995 ; Ehrhardt, 1995)

NodH présente de petites homologies de séquences avec les STs de mammifères, dont la sulfotransférase d'hydrostéroïde de rat, l'arylsulfotransférase de rat et la sulfotransférase d'œstrogène bovine. Il y a cependant des séquences de parties spécifiques qui sont hautement conservées entre *nodH* et ces STs de mammifères, particulièrement dans un tronçon de 126 acides aminés couvrant les résidus 103 à 229 du produit du gène *nodH* (fig 16). Malheureusement, à contrario des autres STs, ces séquences préservées ne semblent pas correspondre aux sites de liaison au PAPS.

3. KpsS

Toujours en relation avec la symbiose des légumineuses avec les bactéries, une étude a démontré que les souches de *Mesorhizobium loti* (souche NZP-2235) produisaient un LPS et un KPS qui subissaient une modification covalente par un sulfate (Townsend, 2006) et que ces modifications étaient nécessaires pour une symbiose normale.

La sulfotransférase responsable de la sulfatation a été étudiée (Townsend, 2008). Le gène responsable de la synthèse de la sulfotransférase a été identifié et nommé *KpsS*. Sa surexpression chez *E.coli* a permis de démontrer que la sulfotransférase modifie le KPS de *M.loti* ainsi que le monosaccharide fucose (substituant proposé du KPS de *M.loti*) mais pas le glucose, le mannose ou le xylose.

KpsS ne présente aucune homologie de séquence avec aucune autre ST bactérienne ou de mammifère, pourtant elle présente des similarités au niveau des ORF's avec celles de plusieurs organismes bactériens. *KpsS*, tout comme les autres STs procaryotes des polysaccharides, ne présente pas la séquence consensus des mammifères GXXGXXK, qui représente le site de liaison au PAPS.

Le gène *KpsS* est localisé dans un groupe d'ORFs qui encodent des protéines requises pour la synthèse de polysaccharides. Des mutations de deux gènes dans cette région aboutissent dans une altération dans le KPS et une réduction du taux de nodulation des racines chez la plante hôte, ce qui laisse penser que *KpsS* est bien indispensable à la biosynthèse de KPS normaux et donc sulfatés.

3. Activités enzymatiques

1. Dosage colorimétrique

L'AST-IV (CE 2.8.2.1), enzyme de détoxification des mammifères, a été étudiée depuis plusieurs années, et des travaux ont été publiés sur son expression et sa purification, (Guo, 1994), sa spécificité d'accepteur et son inhibition (Duffel, 1993 ; Duffel, 1994), et enfin son mécanisme (Marshall, 1997). Au cours de ces études, il est apparu que la catalyse inverse du PAP au PAPS par l'AST-IV est possible par ajout de p-nitrophényl sulfate pour former le produit PAPS de haute énergie (Duffel, 1981). Utilisée pour sa régénération du PAPS à partir du p-nitrophényl sulfate dans la synthèse de glycannes sulfatés (Burkart, 2000), cette synthèse inverse a trouvée une autre utilisation.

Différentes activités enzymatiques de STs ont été déterminées selon une procédure indiquée précédemment (Yang, 1996; Burkart, 1999; Lin, 2000) en utilisant le 4-nitrophényl-sulfate (*p*NPS) comme donneur de groupe de sulfuryle initial. Le PAP sert de cofacteur pour le transfert de groupe de sulfuryle entre le *p*NPS et l'accepteur des STs. Le PAP est d'abord sulfaté à partir du *p*NPS pour donner le PAPS selon une réaction catalysée par l'arylST (fig 18). Le PAPS à son tour transfère le groupe sulfuryle à l'accepteur selon une réaction catalysée par la ST étudiée. La réaction est suivie par la production du *p*NP (*p*-nitrophénol), qui donne une forte absorption à 400 nm ($\epsilon=10.500$ à pH 7). Le

taux calculé reflète le transfert du groupe de sulfuryle du *p*NPS au PAP, résultant de l'utilisation du PAPS par la ST étudiée.

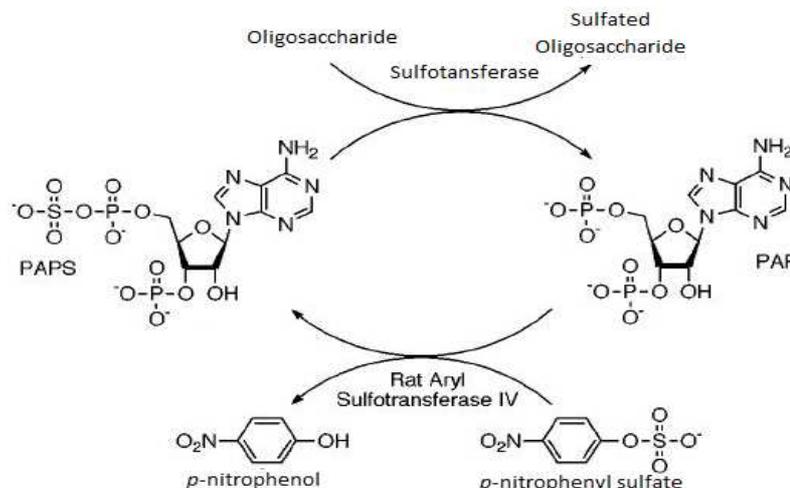


Figure 18 : schéma de réaction de transfert du groupe sulfuryle du *p*-nitrophényl sulfate à l'oligosaccharide sulfaté par l'intermédiaire du PAP, catalysée par l'arylST et une sulfotransférase (Burkart, 2000).

2. Isotope radioactif

Un protocole de dosage des activités enzymatiques des STs utilise les isotopes radioactifs du soufre. Les enzymes purifiées sont testées *in vitro* pour leur capacité à transférer du soufre ^{35}S à partir de ^{35}S -PAPS. Les produits sulfatés marqués sont identifiés et quantifiés après une migration sur gel d'électrophorèse et un comptage du ^{35}S par scintillation liquide (fig 19).

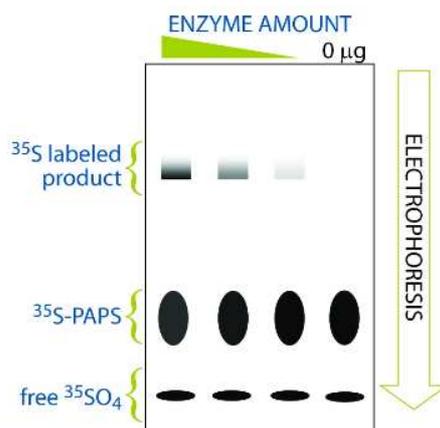


Figure 19 : Schéma représentatif de la migration du substrat et du produit.

La purification et la séparation des produits marqués peuvent également être réalisées en utilisant la chromatographie d'échange d'ions sur une colonne QAE Sephadex A25 avec une élution sélective avec du NaCl. Une quantification de la radioactivité est réalisée grâce à la scintillation liquide (Burkart, 2000).

III. Métabolisme du PAPS

La sulfatation est le transfert d'un groupe sulfate du 3'-phosphoadénosine 5'-phosphosulfate (PAPS) à un substrat qui est catalysée par une famille d'enzymes : les sulfotransférases. C'est le PAPS qui permet le transfert d'un sulfate SO_4 sur un glycanne générant un oligosaccharide sulfaté. Le PAPS est le co-substrat obligatoire et la source du groupe sulfonate qui est synthétisé pour mettre à disposition une «forme activée» de sulfate pour la réaction de sulfatation catalysée par les sulfotransférases cytosoliques ou associées à la membrane.

La sulfatation dans les organismes supérieurs a une exigence stricte pour le PAPS. Cela a été démontré par : 1) la sulfatation n'a pas lieu en l'absence de PAPS *in vitro* ou dans des conditions qui limitent la synthèse de PAPS, 2) le site de liaison putatif pour le PAPS sur les sulfotransférases est conservé entre les différentes classes de sulfotransférases dans les différents tissus et entre les différentes espèces (Komatsu, 1994), et 3) des analogues de structure du PAPS se lient et inhibent les sulfotransférases (Rens-Domiano, 1987).

La sulfatation est un système de conjugaison de haute affinité et de faible capacité dans le métabolisme des xénobiotiques à cause en partie des niveaux d'activité de sulfatation qui peuvent être limités par la disponibilité du PAPS. La participation du PAPS à la réaction dépend de son accessibilité, qui à son tour dépend de sa synthèse, de sa dégradation, et, finalement, de son utilisation dans la réaction de sulfatation. La concentration de PAPS est diminuée avec la sulfatation de doses élevées de substrats et est le facteur limitant dans la capacité de sulfatation. Ainsi, le taux de la synthèse du PAPS peut être un facteur important dans la détermination de l'activité de sulfatation dans les tissus. Un plafonnement de la sulfatation peut se produire en raison de la limitation du débit de synthèse du PAPS.

Le PAPS est synthétisé à partir de l'ATP et du sulfate inorganique dans une réaction en deux étapes. La synthèse du PAPS est tributaire de la disponibilité de sulfate et de l'activité des deux enzymes de la synthèse, l'ATP-sulfurylase et l'APS-kinase. Bien que les propriétés cinétiques de ces deux enzymes soient bien décrites, leurs régulations *in vivo* ne sont pas entièrement comprises. L'analyse de la régulation des enzymes et des niveaux des cofacteurs impliqués dans la synthèse du PAPS est importante pour la compréhension des activités de sulfatation dans les cellules.

1. Les acides aminés comme source de sulfate

La L-méthionine (L-Met) et la L-cystéine (L-Cys) sont deux acides aminés contenant du soufre qui peuvent être une source de sulfate. Ces acides aminés proviennent de l'alimentation et de la dégradation des protéines. La cystéine peut être formée à partir de la méthionine et du catabolisme du glutathion. Au cours de leurs catabolismes, la L-Met et la L-Cys sont décomposées selon la figure 20; le sulfite lui est décomposé par une série de trans-sulfurations et trans-aminations. La sulfite oxydase oxyde facilement le sulfite en sulfate.

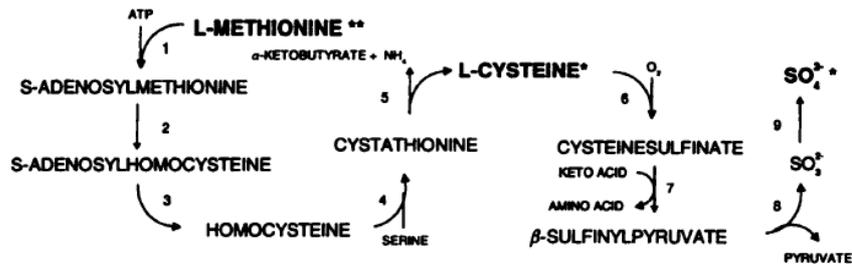


Figure 20 : schéma de décomposition de la L-méthionine et de la L-cystéine en sulfate. 1, L-méthionine S-adenosyltransférase ; 2, L-homocystéine S-méthyltransférase ; 3, S-adenosyl-L-homocystéine hydrolase ; 4, cystathionine β-synthétase ; 5, L-cystathionine cystéinylase ; 6, cystéine di-oxygénase ; 7, cystéine sulfinase transaminase ; 8, non enzymatique ; 9, sulfite oxydase. * délivré par l'alimentation ; ** Nutriment essentiel chez de nombreuses espèces. (Klaassen, 1997).

2. Le rôle du sulfate dans la synthèse du PAPS

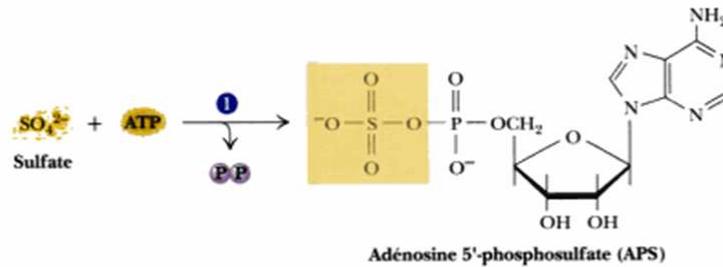
La limitation de la disponibilité du sulfate habituellement ne diminue pas les concentrations à l'équilibre du PAPS lorsque la sulfatation est minime. Toutefois, limiter la disponibilité du sulfate diminue la capacité de synthétiser du PAPS au cours de la sulfatation de fortes doses de substrats exogènes. Par conséquent, la capacité de synthétiser du PAPS à partir de sulfate est un facteur plus important dans la capacité de sulfatation que les concentrations de PAPS à l'équilibre.

3. La disponibilité du PAPS

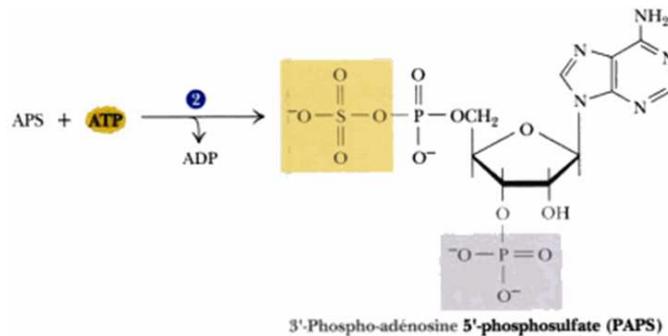
La disponibilité du PAPS pour la sulfatation *in vivo* dépend de sa synthèse, de son transport, de sa dégradation et de son utilisation. La concentration du PAPS disponible est faible par rapport au montant de PAPS nécessaire pour maintenir des taux élevés de sulfatation, indiquant un taux élevé de biosynthèse du PAPS. Par conséquent, une biosynthèse rapide du PAPS est nécessaire à la sulfatation.

Le PAPS est synthétisé rapidement dans une réaction couplée en deux étapes. La voie d'activation du sulfate est composée des enzymes ATP sulfurylase (ATP adénylyltransférase sulfate, CE 2.7.7.4) et APS kinase (ATP adénosine-5'-phosphosulfate 3'-phosphotransférase, EC 2.7.1.25). La première étape

dans cette voie, catalysée par l'ATP sulfurylase en présence de Mg^{2+} , combine l'ATP et les sulfates inorganiques (SO_4^{2-}) pour former l'adénosine 5'-phosphosulfate (APS) et du phosphate inorganique (PPI).



Lors de la seconde étape, catalysée par l'APS kinase en présence de Mg^{2+} , une seconde molécule d'ATP est consommée pour phosphoryler le groupement 3'-hydroxyle du ribose de l'APS et former le PAPS et l'ADP. Cette réaction est catalysée par l'adénosine phosphosulfate kinase (APS kinase) (CE 2.7.1.25)



L'ATP sulfurylase et l'APS kinase sont essentielles pour l'assimilation de sulfate chez la quasi-totalité des organismes. Les réactions qu'elles catalysent ont lieu au début de la branche réductrice de la voie de biosynthèse de la cystéine chez *Escherichia coli* (Schriek, 1986). Ces bactéries couplent l'oxydation des métabolites soufrés réduits à la synthèse d'ATP par phosphorylation oxydative. Chez les mammifères, les sulfates activés fonctionnent principalement en tant que groupe donneur de sulfuryle.

1. L'ATP-sulfurylase

La séquence d'acides aminés déduite de l'ADNc cloné à partir du gène de l'ATP-sulfurylase de plantes, de bactéries, de champignon et de levure montre deux zones conservées, riches en résidus basiques, qui peuvent être les sites de liaison pour le $MgATP$ et le sulfate (Foster, 1994). Il est possible que le $MgATP$ et le sulfate se lient dans ces sites de liaison dans un ordre aléatoire, mais que la libération du produit est ordonnée parce que le $MgPPi$ est libéré avant l'APS. La régulation de l'ATP-sulfurylase chez les organismes supérieurs est peu connue. Cependant, chez la levure, l'ATP-sulfurylase semble être régulée au niveau de la transcription, car l'ATP-sulfurylase est impliquée dans

la biosynthèse de la méthionine chez la levure, et la méthionine dans les milieux de levure réprime à la fois l'activité ATP-sulfurylase et les concentrations de l'ARNm (Cherest, 1985).

Seul l'ATP est efficace comme substrat nucléoside triphosphate pour l'ATP-sulfurylase. Des concentrations élevées de nucléosides triphosphates (GTP, UTP et CTP) ainsi que du Mn^{2+} inhibent l'activité de l'ATP-sulfurylase (Brion, 1987).

2. L'APS-kinase

Les produits protéiques d'ADNc cloné à partir de gène d'APS-kinase de plante, de champignon, de bactéries et de levure sont fonctionnels et montrent de près de 50% d'homologie dans leurs séquences déduite d'acides aminés. Les séquences d'acides aminés contiennent deux régions conservées qui peuvent fonctionner comme sites de liaison et de transfert de groupes phosphate aux nucléotides purine. La liaison des nucléotides à l'APS-kinase est ordonnée; le MgATP se lie d'abord, l'APS se lie alors à l'APS-kinase, ce qui le phosphoryle sous forme PAPS. Le PAPS, se dissocie ensuite de l'APS-kinase, suivie par la dissociation du MgADP.

3. Le couplage entre l'ATP-sulfurylase et l'APS-kinase

Des données génétiques et enzymatiques, notamment le fait que les gènes sont contigus et résident dans le même opéron (Leyh, 1988), impliquent que les protéines encodées sont associées dans un complexe multifonctionnel. La possibilité que ces enzymes soient associées dans un complexe multifonction est particulièrement intéressante à la lumière du fait qu'elles seraient susceptibles de canaliser l'APS, de l'acheminer plus rapidement d'un site actif (ATP-sulfurylase) à un autre site actif (APS-kinase) pour la phosphorylation de l'APS pour former le PAPS (Lyle, 1994). Le taux *in vitro* de production du PAPS à partir de l'APS est légèrement supérieur à celui à partir du sulfate inorganique même si la formation d'APS semble être l'étape limitante de la formation du PAPS (Wong, 1991). Cela implique que l'APS synthétisé de manière endogène peut être plus facilement accessible à l'APS-kinase que l'APS apporté de manière exogène et que le couplage de l'ATP-sulfurylase avec l'APS-kinase peut être l'explication de ce phénomène.

4. Les gènes *cys*

Chez *E. coli*, l'ATP sulfurylase (EC 2.7.7.4) est une enzyme hétéromérique, composée de deux types de sous-unités codées par les gènes *cysN* et *cysD*. L'enzyme native (390 kDa) est un tétramère d'homodimères CysDp-CysNp (Leyh, 1992). La sous-unité CysN possède une activité GTP hydrolase, dont la séquence primaire contient des éléments de consensus liant le GTP, qui conduit à la formation d'APS. Le gène *cysC* encode pour une adénosine 5'-phosphosulfate kinase (APS kinase) (EC 2.7.1.25) (Leyh, 1988).

Chez *E.coli*, la partie sulfuryle du PAPS activé est réduite en sulfite puis en sulfide, pour une utilisation dans la biosynthèse de la cystéine. Chez *E.coli*, le PAPS est utilisé dans la voie de biosynthèse de la cystéine, et ensuite le sulfure de la cystéine est utilisé dans la biosynthèse de méthionine (Ostrowski, 1987).

5. Les gènes *nod*

NodP et *nodQ* de *Rhizobium meliloti* encodent respectivement l'ATP sulfurylase et l'APS kinase (Schwedock, 1990). Ces gènes sont essentiels pour la nodulation chez les légumineuses (Schwedock, 1990). La comparaison des séquences primaires de *cysD*, *cysN*, et *cysC* avec celles prédites pour *nodP* et *nodQ* (fig 21) révèlent des similitudes frappantes.

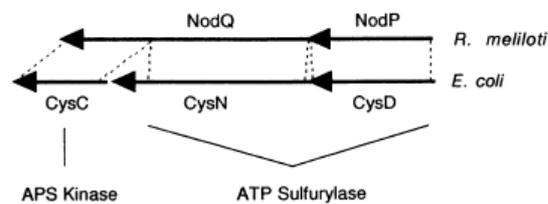


Figure 21 : Schéma de l'homologie entre *nodP* et *nodQ* de *R.meliloti* et *cysD*, *cysN* et *cysC* de *E.coli*. (Schwedock, 1994).

NodP et *cysD*, 68% identiques et 81% similaires, sont très similaires dans la longueur. *NodQ* est similaire aux deux *cysN* et *cysC* (48% identique et 67% similaire à *cysC* et 53% identique et 65% similaire à *cysC*). *NodQ* et *CysC* contiennent une boucle-P identique, séquence consensus du site de fixation des nucléotides. Ces comparaisons confirment que l'APS kinase est en effet codée par *nodQ*. *NodQ* contient aussi la séquence consensus de liaison au GTP (Schwedock, 1989).

Des clones d'*E.coli* exprimant les gènes *nodP* et *nodQ* sont capables de compléter l'auxotrophie cystéine des bactéries déficientes en activités ATP sulfurylase et APS kinase (Schwedock, 1994).

Il existe deux copies des gènes *nodPQ* chez *R.meliloti*, chacun localisés sur un des plasmides Sym. Ce second locus, localisé sur pSymb, pourrait permettre une synthèse de PAPS utilisé dans la sulfatation des LPS et autres produits extracellulaires. Seul le double mutant produit une forme non sulfatée du facteur de croissance.

La demande de PAPS pour la sulfatation des RCOs est d'environ 20 $\mu\text{mol/g}$ de cellules sèches, alors que la demande de PAPS pour la biosynthèse de la cystéine et la méthionine sont respectivement de 87 et 146 $\mu\text{mol/g}$ de cellules sèches (Häuselmann, 1996). Les gènes *nodP* et *nodQ* ne devraient pas être nécessaires pour des productions d'oligosaccharides sulfatés chez *E.coli* car le PAPS peut être produit grâce à *cysC*, *cysD* et *cysN* (Leyh, 1992). Les gènes *cysCDN* font partie du régulon de la cystéine qui est réprimée en présence de cystéine et d'autres composés sulfatés (Kredich, 1996). Cela

veut dire que les sulfatations *in vivo* requièrent que le milieu de culture ne doive contenir que des sulfates comme source de sulfate.

6. Les gènes *met*

Une comparaison entre les séquences d'acides aminés des gènes d'*E.coli* *cysD*, *cysN* et *cysC* (ECDNC), des gènes de *R.meliloti* *nodP* et *nodQ* (RMEPQ), des gènes de *A.brasilens* *nodP* et *nodQ* (ABRPQ) et du gène de levure de l'APS kinase (MET14) montre de nombreuses homologies de séquences d'acides aminés (Schwedock, 1994) (fig 22).

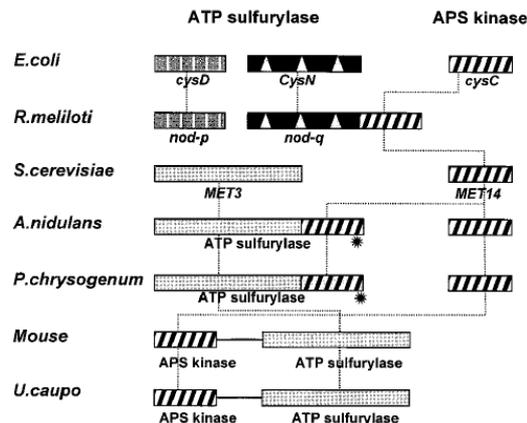


Figure 22 : structures des gènes ATP sulfurylase et APS kinase et leurs similitudes chez les bactéries, les champignons et les eucaryotes supérieurs. Les régions similaires sont ombragées de manière appropriée (Thomas, 1997).

Chez la levure, le PAPS est utilisé directement pour donner la méthionine comme dans la biosynthèse de la cystéine. La levure peut aussi faire de la méthionine à partir de la cystéine et inversement *via* la cystathionine

Chez *S. cerevisiae*, l'APS kinase est codée par le gène *met14* (Masselot, 1977), qui présente des similarités de séquence avec les APS kinases de bactéries, champignons, et des plantes. En revanche, la séquence du gène *Met3p* de *S. cerevisiae* ne présente pas d'importantes homologies de séquence avec l'ATP sulfurylase d'*E.coli*. La PAPS réductase de *S. cerevisiae* est encodée par le gène *met16* (Masselot, 1977). *Met16p* a des fortes similitudes de séquences avec la PAPS réductase d'*E.coli* et de champignons.

Il a été observé que des souches portant une mutation pour *met3* (sulfurylase ATP), *met14* (APS kinase), ou *met16* (PAPS réductase) sont toutes défectueuses en transport de sulfate (Thomas, 1990), ce qui suggère qu'un complexe multi-enzyme pourrait être impliqué dans le transport et l'activation du sulfate chez *S.cerevisiae*. La possibilité qu'un tel complexe multi-enzyme existe dans la levure a été renforcée par l'analyse des cellules mutantes MET3 exprimant le gène *ASA1*, qui code pour l'ATP sulfurylase de chloroplastes d'*Arabidopsis thaliana*. Dans de telles cellules, l'activité ATP sulfurylase a été restaurée (Logan, 1996).

IV. L'usine cellulaire

1. Le concept

Actuellement, le procédé d'usine cellulaire est la voie la plus intéressante pour la synthèse *in vivo* d'oligosaccharide d'intérêt biologique en grande quantité (Samain, 1997). Cette technique comprend une seule étape de culture à haute densité d'une souche d'*E.coli* génétiquement modifiée (fig 23). L'accepteur exogène, internalisé dans la bactérie sans être modifié, est pris en charge par les glycosyltransférases codées par des gènes surexprimés. Ces enzymes ont pour activité de transférer des unités monosaccharidiques sur l'accepteur à partir des nucléotides sucres donneurs produits et recyclés naturellement par la même bactérie, ce qui ne présente donc plus un facteur limitant. La bactérie en croissance est métaboliquement active et produit efficacement l'ATP pour la phosphorylation oxydative.

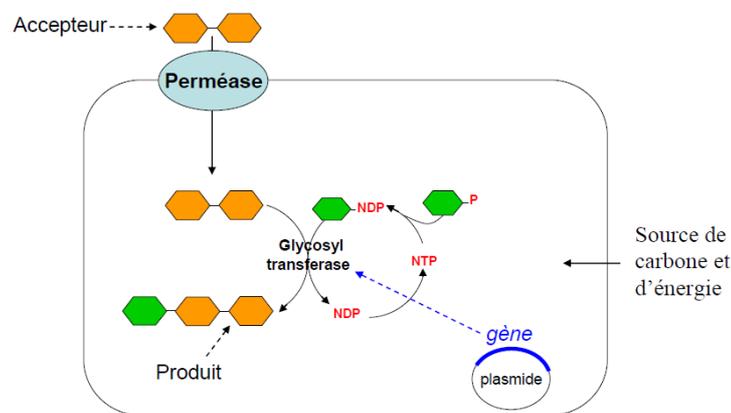


Figure 23 : Principe de l'usine cellulaire.

2. Internalisation de l'accepteur

La souche d'*E.coli* a développé un système d'importation de molécules glucidiques, souvent des monosaccharides ou des disaccharides, pour disposer de source d'énergie et de carbone. Ce système est détourné dans la méthode d'usine cellulaire pour internaliser la molécule accepteur. Cette dernière, ajoutée dans le milieu extracellulaire, peut être transportée à l'intérieur de la bactérie de façon passive ou active. La diffusion passive dépend uniquement du gradient de concentration de la molécule qui passe librement à travers la membrane bactérienne et n'est facilitée par aucune protéine. Elle concerne des petits groupes hydrophobes comme, par exemple, le monosaccharide modifié GlcNAc-allyl. Néanmoins, la concentration intracellulaire en substrat reste faible (Samain, 1999). Le transport actif met en jeu un transporteur par gradient chimique utilisant le potentiel de membrane créé par la différence de charges entre les milieux extracellulaire et intracellulaire pour déplacer les molécules saccharidiques. La perméase LacY, par exemple, est un symporteur et le déplacement du

lactose vers le cytoplasme s'accompagne d'un flux de protons dans le même sens (fig 24). L'ingénierie métabolique de notre étude exploite ce système d'internalisation.

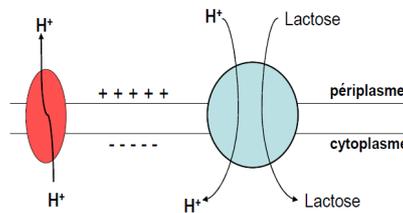


Figure 24 : le symporteur du lactose. Pompe à protons en rouge, transporteur symport H⁺/lactose en bleu.

La molécule doit rester intacte après internalisation pour être reconnue par les glycosyltransférases. Il est donc nécessaire d'inactiver les voies de catabolisme des molécules internalisées. Le galactose internalisé par la bactérie est normalement phosphorylé par la galkinase GalK et les souches mutantes *galK*⁻ ont été construites pour empêcher cette activité. De la même façon, pour les souches mutantes *lacZ*⁻ *lacY*⁺, l'hydrolyse du lactose par la β -galactosidase LacZ qui a lieu dans la souche sauvage n'est plus possible. Il a été démontré que la perméase LacY possède une large spécificité et peut internaliser des trisaccharides possédant un galactose en liaison β - ou α - du côté non réducteur comme par exemple le globotriose. Le lactose modifié portant un groupement allyle sur le glucose réducteur peut également pénétrer dans le cytoplasme de cette façon (Fort, 2008).

3. Les glycosyltransférases

La glycosylation par les glycosyltransférases se fait de façon simple par addition successive de résidus glucidiques sur un précurseur. Les gènes eucaryotes étant peu ou pas fonctionnels chez *E.coli* sont difficilement exploitables dans notre système d'expression bactérien. Les glycosyltransférases des mammifères sont des protéines de type II caractérisées par un court domaine N-terminal tourné vers le cytoplasme, un domaine transmembranaire hydrophobe d'ancrage et une région tige liée au domaine C-terminal catalytique connecté au lumen de l'appareil de Golgi (fig 25).

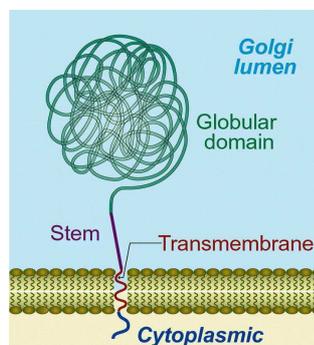


Figure 25 : représentation schématique d'une glycosyltransférase eucaryote.

La région tige peut être clivée par des protéases présentes dans le lumen et relarguée sous une forme active soluble. De cette manière, les glycosyltransférases de mammifères peuvent être produites dans la bactérie par surexpression du gène tronqué ne codant que pour le domaine catalytique. Cette stratégie a été appliquée pour la production de l'enzyme α -3 GalT bovine pour la synthèse enzymatique de l'épitope α -Gal (Fang, 1998). Cette GalT appartient à la famille 6 des GTs qui comprend également les glycosyltransférases GtA et GtB responsables des synthèses des épitopes des antigènes des groupes sanguins A et B. Il a été montré que ces deux enzymes peuvent être exprimées chez *E.coli* et utilisées pour les synthèses enzymatiques des antigènes des groupes sanguins. Souvent, les protéines eucaryotes recombinantes produites par les bactéries sont dirigées vers le périplasma qui constitue un milieu oxydant permettant la formation des ponts disulfures par le système Dsb (Rietsch, 1998). En effet, le cytoplasme est un milieu réducteur qui empêche la formation des ponts disulfures et c'est pourquoi les enzymes eucaryotes ne sont pas correctement produites chez *E.coli*. Cependant, cette stratégie ne peut être utilisée dans notre système d'usine cellulaire car les GTs surexprimées ne sont plus disponibles dans le cytoplasme pour la réaction de glycosylation.

Contrairement aux gènes eucaryotes, les gènes procaryotes sont généralement bien exprimés chez *E.coli*. Les enzymes d'origine eucaryote sont naturellement opérationnelles dans le cytosol. La plupart des gènes responsables de la synthèse des structures oligosaccharidiques retrouvés chez les bactéries ont été identifiés et caractérisés. Ils constituent des outils essentiels pour la production des oligosaccharides par notre système d'usine cellulaire.

4. Les voies de biosynthèse des nucléotide-sucres

Les nucléotide-sucres de la souche *E.coli* K12 sont essentiellement produits pour permettre la synthèse des constituants oligosaccharidiques de la membrane externe (LPS, acide colanique...). Dans notre système de production, ces voies métaboliques de biosynthèse des nucléotide-sucres ont été développées afin de disposer des donneurs en quantité importante dans la bactérie.

1. Biosynthèse de l'UDP-GlcNAc

La bactérie *E.coli* synthétise de l'UDP-GlcNAc, utilisé pour former les peptidoglycannes et le lipide A qui sont des structures vitales pour la bactérie. La production en grande quantité du trisaccharide LNT2 (GlcNAc β -3Gal β -4Glc) par culture à haute densité de la souche d'*E.coli* surexprimant le gène *lgtA* codant pour la β -3 GlcNAcT, démontre que la bactérie peut fournir assez d'UDP-GlcNAc pour la synthèse (Mergaert, 1995). Le taux maximal de transfert d'UDP-GlcNAc a atteint 1.25 mmol/h/L lors de la synthèse du LNT2 à partir du lactose (Priem, 2002). Ainsi, aucune ingénierie métabolique n'est opérée dans la souche d'*E.coli* K12 pour la production des oligosaccharides contenant des résidus GlcNAc.

2. Biosynthèse de l'UDP-Gal

La souche d'*E.coli* K12 assure un flux minimal de biosynthèse d'UDP-Gal pour la synthèse des composants glucidiques de son LPS et de l'acide colanique. Plusieurs molécules galactosylées ont été déjà obtenues par la méthode d'usine cellulaire et le taux maximal de galactosylation a été observé lors de la synthèse du Gb3 à partir du lactose par une souche d'*E.coli* surexprimant le gène *lgtC* codant pour une α -4 GalT. Le rendement de production a été de 1.2 g/L/h, ce qui correspond à un taux de galactosylation de 2.7 mmol/h/L (Antoine, 2005). Cet exemple prouve que la quantité d'UDP-Gal produit naturellement par la bactérie est suffisante pour la synthèse des oligosaccharides galactosylés et qu'aucune ingénierie métabolique n'est nécessaire pour transformer la bactérie en usine cellulaire.

3. Biosynthèse du GDP-fucose

Les quatre gènes impliqués dans la synthèse du GDP-fucose à partir du Man6P font partie de l'opéron pour la production de l'acide colanique (Stevenson, 1996) (fig 26). Le Man6P est converti en GDP-Man par la phosphomannomutase et la Man1P guanosyltransférase codées respectivement par les gènes *manB* et *manC*. L'étape suivante consiste en une déshydratation du GDPMan en GDP-4-keto-6-deoxy-D-mannose grâce au gène *gmd*. Le GDP-fucose est obtenu par l'action de la fucose synthase WcaG (Andrianopoulos, 1998).

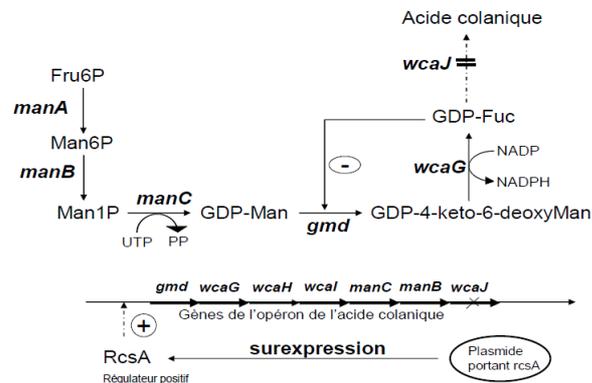


Figure 26 : Voie de biosynthèse du GDP-Fuc chez *E.coli*.

Les gènes de la biosynthèse du GDP-Fuc sont donc co-régulés avec ceux de l'acide colanique ; or, l'acide colanique n'est produit par la bactérie que dans des états de stress. Par conséquent, le GDP-Fuc ne peut pas être obtenu dans des conditions normales de culture. Un système d'ingénierie métabolique a été mis au point pour disposer du GDP-fucose dans la souche d'*E.coli*. Il consiste à surexprimer le gène *rscA* qui code pour une protéine qui régule positivement des gènes de la biosynthèse de l'acide colanique, donc aussi du GDP-fucose (Dumon, 2001). Cependant cette stratégie requiert obligatoirement une souche mutante *wcaJ*.

4. Biosynthèse de l'UDP-GlcA

Comme la plupart des espèces d'entérobactéries, *E. coli* K-12 sécrète un exopolysaccharide, qui contient de l'acide glucuronique et peut donc synthétiser de l'UDP-GlcA à partir d'UDP-glucose dans une réaction catalysée par l'UDP-glucose déshydrogénase (UGD). *E. coli* K5 produit un polysaccharide capsulaire avec une structure de répétition de base similaire à celle de l'héparine. Cette bactérie possède une UGD supplémentaire, encodée par le gène *kfiD* (Petit, 1995). Plusieurs molécules glucuronylées ont été déjà obtenues par la méthode d'usine cellulaire (Yavuz, 2009), et la surexpression de *kfiD* a été en mesure de stimuler la synthèse jusqu'à l'épuisement total de l'accepteur. Finalement, il a été démontré que l'expression du gène *kfiD* est requise pour une glucuronylation efficace.

5. La culture à haute densité

La masse des oligosaccharides produits lors de la fermentation représente généralement 1 à 10% du poids sec (PS) de la biomasse. Cela signifie que 10 à 100 mg d'oligosaccharides peuvent être obtenus à partir d'une culture bactérienne dans un erlenmeyer où le PS est de 1 g/L. Les cultures en erlenmeyer conviennent aux tests de comparaison de souches ou encore aux tests d'utilisation de nouveaux accepteurs ; elles permettent de valider un procédé mais pas d'obtenir de grandes quantités de produit. En revanche, si la production vise un rendement de l'ordre du gramme, le PS des bactéries doit être augmenté d'un facteur 100 en menant une culture à haute densité dans des fermenteurs. Une façon d'améliorer la production volumique d'une culture bactérienne est d'augmenter la densité bactérienne. Le point crucial de cette méthode est la synthèse des oligosaccharides par des bactéries en croissance. Les paramètres de fermentation sont définis de façon à contrôler la croissance tout en optimisant la production. Différentes stratégies permettent la culture d'*Escherichia coli* à haute densité de cellules. La culture à haute densité engendre trois types de problèmes à résoudre :

La limitation et/ou l'inhibition des substrats : Le milieu de culture utilisé est un milieu minéral qui facilite le contrôle de la croissance et la bonne solubilité des différents substrats. En effet, les milieux riches, très concentrés ont tendance à inhiber le développement des bactéries et à favoriser la contamination.

La formation d'acétate : des sous-produits acides tels que l'acide acétique ont tendance à s'accumuler dans le milieu de culture et vont gêner également la croissance bactérienne (Lee, 1996). La forme protonée de l'acétate interfère avec la production d'ATP en réduisant la différence de pH de la force motrice. L'acétate est produit en réponse à une sous-oxygénation des bactéries qui passent en mode anaérobie, par conséquent, l'apport en O₂ est minutieusement surveillé (Geremia, 1994).

La limitation en oxygène : les cultures demandent de grandes quantités d'oxygène O₂. Cependant l'apport en O₂ du fermenteur est limité et sa solubilité est limitée. Il faut donc veiller à

avoir une bonne agitation au cours de la fermentation. Une autre façon d'éviter le manque d'O₂ est de réguler la croissance bactérienne en abaissant la température de production à 28°C et en adaptant l'alimentation en source de carbone.

Pour optimiser tous les paramètres de culture et limiter au maximum la production de sous-produits, la fermentation, adaptée par le laboratoire, se déroule en trois étapes (fig 27). La première phase correspond à la croissance exponentielle des bactéries avec un apport initial de 17.5 g/L en source de carbone qui peut être du glucose ou du glycérol. Ce dernier est préféré par rapport au glucose car son catabolisme limite l'accumulation d'acétate dans le milieu. En revanche, selon la toxicité des gènes surexprimés chez *E.coli*, le glucose permet une répression catabolique du promoteur Lac des vecteurs. Après consommation des 17.5 g initiaux, la culture se poursuit par deux phases d'alimentation en continu avec du glycérol. La deuxième phase dure 5 heures avec un débit d'alimentation de 4.2 g/L/min de façon à atteindre rapidement une biomasse élevée. La dernière phase est menée avec un débit de 3.2 g/L/min jusqu'à la fin de la culture. Ainsi, la croissance est ralentie et un minimum d'activité métabolique est maintenu pour la production d'oligosaccharides. L'accepteur est ajouté au début des phases d'alimentation pendant la phase exponentielle de croissance des bactéries. Au même moment, le système est induit par addition d'IPTG pour produire les glycosyltransférases.

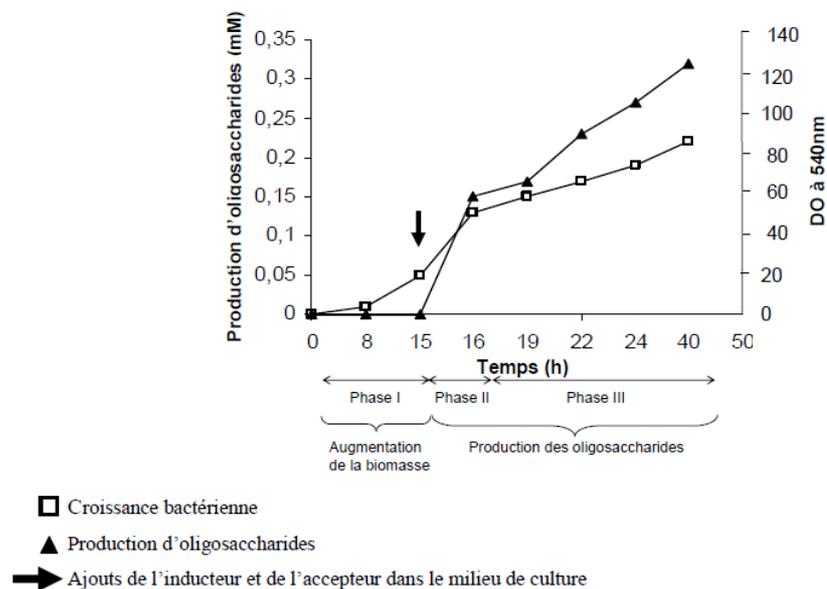


Figure 27 : culture à haute densité d'une souche JM109 cultivée sur le glycérol

Dans les conditions de culture à haute densité, le PS de la biomasse atteint les 100 g/L et le rendement en oligosaccharides de la production est de 1 à 10 g. Cette technique est assez facile à mettre en œuvre grâce à un fermenteur de 2 L dont la température, le pH, l'apport en O₂ sont contrôlés, et qui possède une pompe péristaltique pour l'alimentation. A la fin de la culture, le surnageant est séparé du culot bactérien pour récupérer les fractions extra- et intracellulaires. Elles sont toutes les

deux purifiées et leurs compositions sont analysées. La nature des oligosaccharides retrouvés dans les milieux extra- et intracellulaires dépend de leur taille, de leur hydrophobicité et de leur concentration intracellulaire. Il a été observé qu'une partie des oligosaccharides produits par la méthode d'usine cellulaire est relarguée dans la fraction extracellulaire. Le mécanisme de sortie des oligosaccharides n'a pas été clairement identifié mais il est probable qu'une diffusion passive s'effectue à travers la membrane.

6. Les oligosaccharides produits par la méthode d'usine cellulaire

Le tableau x rassemble une partie des diverses structures oligosaccharidiques obtenues jusqu'à présent. L'accepteur dans le milieu réactionnel subit une multi-glycosylation séquentielle, réaction qui augmente considérablement la taille, la complexité et la diversité des structures synthétisées. Ce procédé fait appel à de nombreuses glycosyltransférases dont les gènes sont mentionnés dans le tableau 7.

Structures	Nom	Gènes	Rdt *	Références
Accepteur Lac				
Galβ-4GlcNAcβ-3Galβ-4Glc	LNnT	<i>lgtA, lgtB</i>	5	Priem <i>et al.</i> , 2002
[Galβ-4GlcNAcβ-3]2Galβ-4Glc	LNnH	<i>lgtA, lgtB</i>	ND	Priem <i>et al.</i> , 2002
[Galβ-4GlcNAcβ-3]3Galβ-4Glc	LNnO	<i>lgtA, lgtB</i>	ND	Priem <i>et al.</i> , 2002
[Galβ-4GlcNAcβ-3]4Galβ-4Glc	LNnD	<i>lgtA, lgtB</i>	ND	Priem <i>et al.</i> , 2002
Galβ-4GlcNAcβ-3Galβ-4(Fuca-3)Glc	LNnFP-V	<i>lgtA, lgtB, futA, rcsA</i>	3	Dumon <i>et al.</i> , 2004
Galβ-4(Fuca-3)GlcNAcβ-3Galβ-4(Fuca-3)Glc	LNnFH-II	<i>lgtA, lgtB, futA, rcsA</i>	ND	Dumon <i>et al.</i> , 2004
Galβ-4(Fuca-3)GlcNAcβ-3Galβ-4Glc	Lex	<i>lgtA, lgtB, futA, rcsA</i>	ND	Dumon <i>et al.</i> , 2006
Fuca-2Galβ-4Glc	2'FucLac	<i>futC, rcsA</i>	14	Drouillard <i>et al.</i> , 2005
Fuca-2Galβ-4GlcNAcβ-3Galβ-4Glc	AgH-2	<i>lgtA, lgtB, futC, rcsA</i>	ND	Drouillard <i>et al.</i> , 2005
Neu5Acα-2Galβ-4Glc	GM3	<i>nst, neuA</i>	2.6	Priem <i>et al.</i> , 2002
GalNAcβ-4(Neu5Acα-3)Galβ-4Glc	GM2	<i>nst, neuA, wbpP, cgtA</i>	1.2	Antoine <i>et al.</i> , 2003
Galβ-3GalNAcβ-4(Neu5Acα-3)Galβ-4Glc	GM1	<i>nst, neuA, wbpP, cgtA, cgtB</i>	0.9	Antoine <i>et al.</i> , 2003
Neu5Acα-8Neu5Acα-3Galβ-4Glc	GD3	<i>cstII, neuA</i>	0.8	Antoine <i>et al.</i> , 2005
[Neu5Acα-8]2Neu5Acα-3Galβ-4Glc	GT3	<i>cstII, neuA</i>	0.9	Antoine <i>et al.</i> , 2005
Galα-4Galβ-4Glc	Gb3	<i>lgtC</i>	7	Antoine <i>et al.</i> , 2005
Accepteur Gal				
Galβ-4GlcNAcβ-3Gal	type 2	<i>lgtA, lgtB</i>	ND	Priem <i>et al.</i> , 2002
Galβ-4(Fuca-3)GlcNAcβ-3Gal	4Lex	<i>lgtA, lgtB, futA, nanBC, gmd, wcaG</i>	6	Dumon <i>et al.</i> , 2006
Accepteur Gb3				
GalNAcβ-3Galα-4Galβ-4Glc	Gb4	<i>lgtD, wbpP</i>	0.9	Antoine <i>et al.</i> , 2003

* g/L

Tableau 7 : Structures oligosaccharidiques produites par la méthode d'usine cellulaire.

7. L'utilisation des oligosaccharides comme accepteurs de sulfatation

Le procédé d'usine cellulaire a été inventé et développé dans notre laboratoire. L'activité « oligosaccharides recombinants » est l'un des fleurons de la recherche menée au CERMAV dans le domaine des glycosciences. La banque de glycanes recombinants produits actuellement est vaste mais une seule structure sulfatée est représentée : les chitoooligosaccharides sulfatés (Samain, 1997). Pourtant les glycanes sulfatés sont des motifs oligosaccharidiques assez répandus, retrouvés chez toutes les espèces, d'une grande importance biologique car ils sont impliqués dans de nombreux processus biologiques comme nous l'avons vu. L'appréhension des nouvelles synthèses telles que celles de ces glycanes sulfatés semble donc nécessaire pour conserver le leadership que nous possédons actuellement au laboratoire. La possibilité de fournir au monde scientifique une banque de glycanes sulfatés plus vaste et plus diversifiée, en grande quantité et facilement, représente également un challenge appréciable.

Par chance, parmi les structures glycaniques dont nous maîtrisons la biosynthèse, plusieurs s'avèrent être des structures précurseurs de sulfatation. L'étude et le développement de sulfotransférases actives sur ces motifs et capables de réaliser la biosynthèse totale *in vivo* chez *E.coli* de motifs sulfatés d'intérêt est un challenge ambitieux que nous avons essayé de relever.

8. La levure *S.cerevisiae*

La production des glycanes chez *E.coli* par le procédé d'usine cellulaire est actuellement bien maîtrisée et permet la biosynthèse de nombreuses structures oligosaccharidiques. Les avantages de l'utilisation d'une telle technique sont nombreux et les inconvénients moindres. Cependant l'adaptation d'une telle technologie à un autre organisme peut s'avérer payant. Notamment, la production de la plupart des glycanes d'intérêt est réalisée pour l'étude et la compréhension de l'action de ces glycanes dans des mécanismes d'action chez l'homme. De ce fait, la plupart des gènes surexprimés et utilisés chez *E.coli* sont d'origines eucaryotes. Bien que cela ne pose généralement pas de problèmes, l'expression de gènes eucaryotes, et de fait la production de motifs d'origine eucaryotes, chez un organisme procaryote peuvent s'avérer difficile et contraignant.

En parallèle, le développement de systèmes de production de protéines recombinantes qui peuvent être appliqués à un large éventail d'objectifs est un domaine clé de la recherche. Cela est particulièrement vrai pour la production de protéines membranaires et qui ne peuvent pas encore être produits avec des rendements élevés d'une manière prévisible. La production de protéines recombinantes est universellement utilisée comme une solution pour obtenir des milligrammes, voire des grammes d'une protéine donnée nécessaire pour des applications aussi diverses que la génomique structurale et la fabrication de produits biopharmaceutiques. Cette optique a été appliquée à la production de glycanes chez la bactérie. Maintenant nous envisageons de transférer cette approche à la biosynthèse de glycanes d'intérêt chez la levure.

Le modèle de levure que nous avons utilisé pour appliquer le procédé d'usine cellulaire à la production à haute densité de glycanes d'intérêt chez la levure est l'organisme *Saccharomyces cerevisiae*.

Utilisée depuis longtemps pour la production de pain, de vin, la levure *S.cerevisiae* a été très étudiée et bien caractérisée. Une grande connaissance de sa génétique, de sa physiologie et de sa biochimie ont été atteints, permettant l'établissement de robustes méthodologies de biologie moléculaire et de technologies de fermentation. Après la révolution génomique, de nombreux outils ont été développés utilisant la levure, et de nombreuses informations à propos des niveaux d'expression des gènes, des structures et des flux des métabolites sont disponibles et facilement accessibles. *S.cerevisiae* est largement utilisé comme usine cellulaire dans l'industrie biotechnologique, mais elle sert également d'organisme modèle eucaryote.

S.cerevisiae est un microorganisme unicellulaire et comparé aux eucaryotes supérieurs, sa manipulation génétique est facile. Une grande variété de vecteurs d'expression, de marqueur d'auxotrophie et de protocoles de transformation efficaces sont disponibles. Plusieurs techniques de biologie moléculaires sont appliquées en routine avec cet organisme et une grande collection de mutants a été construite, caractérisée et rendue disponible.

De plus, la levure est un organisme au statut GRAS (Generally Regarded As Safe), faisant de lui une plateforme de production attractive pour de multiples applications. Due à sa facilité de culture sur des milieux minimum minéral sans conditions particulières, et soutenu par sa longue utilisation avec des fermentations à grande échelle, cette levure est l'une des usines de cellules les plus employée pour la production de protéines recombinantes et de produits chimiques.

Comme les microorganismes compartimentés, *S.cerevisiae* est capable, à la différence des procaryotes, d'effectuer la transformation et le repliement des protéines, un aspect particulièrement attractif pour l'expression de protéines recombinantes de mammifères. Cependant, les levures et l'homme ont des voies de glycosylation différentes, ce qui peut être un inconvénient si cela conduit à la formation de protéines qui induisent une réponse immunogénique.

S.cerevisiae s'avère donc une option attrayante et flexible pour la biosynthèse de glycanes recombinants dans le cadre de l'usine cellulaire.

RESULTATS ET DISCUSSION

I. Essai de sulfatation chez *Escherichia coli* K12

1. Biosynthèse totale *in vivo* de l'épitope HNK-1

Le motif épitope HNK-1 a été caractérisé comme le trisaccharide 3-sulfo-GlcA(β 1-3)Gal(β 1-4)GlcNAc. La HNK-1ST de *Rattus norvegicus* est responsable *in vitro* de la biosynthèse de l'épitope HNK-1 sur les glycoprotéines et des glycolipides (Bakker, 1997) à partir du motif accepteur naturel oligosaccharidique non sulfaté HNK-1 atypique (GlcA(β 1-3)Gal(β 1-4)GlcNAc-R). La HNK-1ST est également capable de réaliser une sulfatation du motif GlcA-Lac, dont la biosynthèse est maîtrisée dans le cadre de l'usine cellulaire (Yavuz, 2008). Des essais de sulfatation avec la HNK-1ST *in vivo* sur cet accepteur ont donc été réalisés dans le cadre de l'« usine cellulaire » chez *E.coli*. Plusieurs voies de biosynthèses ont été testées à partir de différents accepteurs lactosides et de différents gènes de sulfotransférases codant pour une HNK-1ST.

1. Biosynthèse et disponibilité des précurseurs de sulfatation

La production du GlcA-Lac au laboratoire a été réalisée à partir du lactose internalisé par la souche HN7 qui surexprime le gène *glcAT-P* codant pour la β 1-3 glucuronyltransférase de souris *Mus musculus* et le gène *kfiD* encodant pour la UDP-Glc déshydrogénase de *E.coli* K5, cette dernière permettant de disposer d'une réserve endogène d'UDP-GlcA dans la cellule bactérienne (fig 28). L'expression du plasmide pBS-*glcAT-kfiD* chez *E.coli* K12 en culture haute-densité a permis la biosynthèse du motif GlcA-Lac dans ces conditions à 4 g par litre de culture.

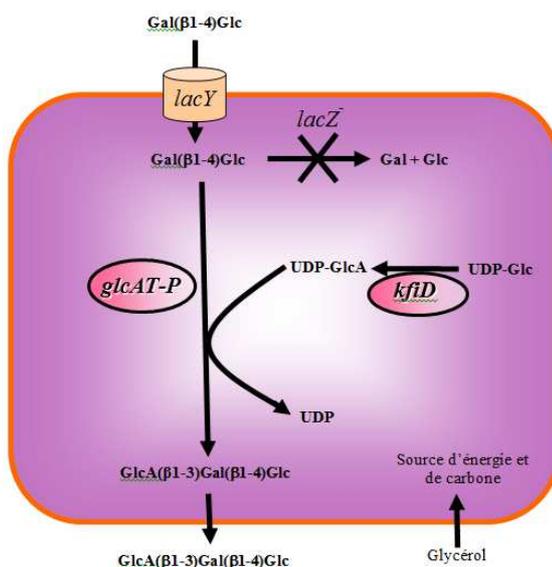


Figure 28 : Voie de biosynthèse *in vivo* pour la production de GlcA-Lac-Allyle dans les bactéries recombinantes *E.coli*. Le lactose est internalisé par la β -galactoside perméase *lacY* et ne peut pas être dégradé à cause de l'inactivation de *lacZ*. Il est glucuronylé par la glucuronyltransférase β 1,3-GlcAT encodée par le gène *glcAT-P* de *M.musculus*. Parallèlement, l'UDP-glucose déshydrogénase de la souche d'*E.coli* K5 (*kfiD*) catalyse la synthèse endogène d'UDP-GlcA.

a) Biosynthèse du GlcA-Lac

Lors de la biosynthèse par Yavuz et *al.* du GlcA-Lac par la souche HN7, le plasmide utilisé était le pBlueScript-*glcAT-kfiD*. Dans notre stratégie mise en place pour l'étude de la sulfatation par la HNK-1ST, ce plasmide n'était pas compatible avec les plasmides d'expression porteurs du gène *hnk-1STr* à cause des résistances antibiotiques et des origines de répllication. Le choix a donc été fait de cloner le duo de gènes *GlcAT-kfiD* sur un plasmide pACT3. Ce plasmide est caractérisé par un plus faible nombre de copies (ori P15A) compensé par un promoteur Ptac plus fort que le Plac, ce qui lui confère un niveau global d'expression équivalente aux plasmides Plac/ColE1 (Dykhhoorn, 1996). Le plasmide pACT-*glcAT-kfiD* a ainsi été construit et transformé dans la bactérie hôte ZW (souche dérivée K12 du laboratoire) pour former la nouvelle souche LB-10.

La culture de 200 mL de la souche LB-10 a été réalisée dans les conditions standards avec 5 g/L de lactose et une alimentation glycérol 50%. Au bout de 76 heures de production, aucun problème de croissance n'a été observé et la culture a été arrêtée. Une analyse par CCM (fig 29) du suivi de la culture a été réalisée.

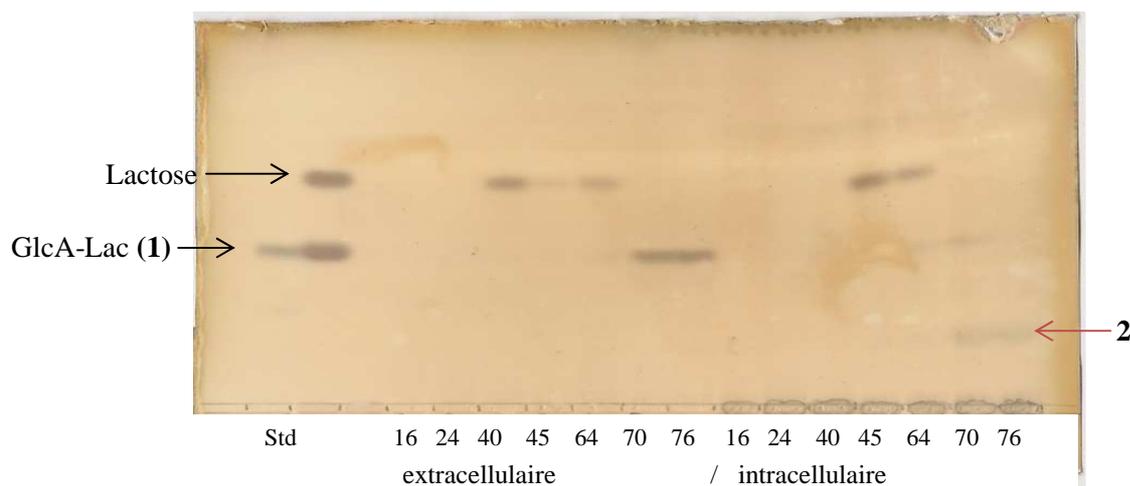


Figure 29 : chromatographie sur couche mince des fractions extracellulaire et intracellulaire issues de la culture de la souche LB-10 surexprimant les gènes *glcAT-P* et *kfiD* sur le plasmide pACT3 à différents temps de culture : 16 heures, 24 heures (induction), 40 heures, 45 heures, 64 heures, 70 heures et 76 heures (Arrêt) à partir de 5 g/L de lactose.

L'accepteur initial lactose est accumulé dans le milieu intracellulaire où il a été entièrement modifié en produit **1**. Le produit **1** a été identifié comme le produit attendu GlcA-Lac, ce qui validait le fait que l'expression des gènes *glcAT-P* et *kfiD*, cloné dans le plasmide d'expression pACT₃, permettait toujours une addition de l'acide glucuronique sur le lactose.

Finalement la formation en fin de culture dans la fraction intracellulaire d'un second produit **2** a été détecté. Le produit **2** a été purifié sur CCM et a été identifié par spectrométrie de masse basse résolution comme étant de l'UDP-GlcA. La formation en fin de culture d'UDP-GlcA était le résultat

de la surexpression du gène *kfiD* par les bactéries. Cette surproduction d'UDP-GlcA n'avait pas été constatée lors de l'expression du gène *kfiD* dans le vecteur pBlueScript.

Une concentration importante de précurseur de glucurylation pouvait être gênante lors des phases de purification des produits sulfatés sur résines échangeuses d'anions. En effet, l'UDP-GlcA, porteur de la fonction GlcA, se comporte comme un produit chargé négativement et fournit un sous-produit non désiré contaminant de plus lors de l'élution, impliquant une plus grande difficulté de purification des oligosaccharides sulfatés, d'où une baisse de rendement.

Nous avons donc cherché à empêcher la sur-production d'UDP-GlcA. Pour cela, le gène *GlcAT-P* a été conservé sur le plasmide pACT₃ mais le gène *kfiD* a été exprimé à un niveau plus faible dans un plasmide pBBR3, porteur de l'ori *bhr* à faible copie et porteur du promoteur Plac inducible aux β -galactosides. Le plasmide recombinant a été co-transformé avec le plasmide pACT-*glcAT* dans la souche ZW pour donner la souche recombinante LB-11.

La culture de 200mL de la souche LB-11 a été réalisée dans les conditions standards à partir de 10 g/L de lactose initial et une alimentation en glycérol 50% additionnée de 10 g/L de lactose. La culture s'est déroulée sans problème de croissance et a été arrêtée après 24 heures de production. Une analyse par CCM des fractions intra- et extracellulaire finales a été réalisée (fig 30).

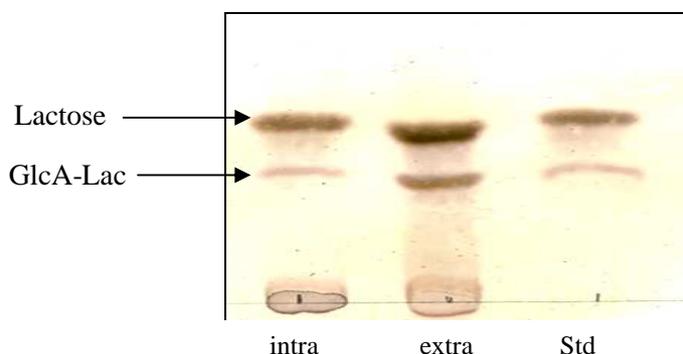


Figure 30 : chromatographie sur couche mince des fractions intracellulaire et extracellulaire issues de la culture de la souche LB-11 surexprimant les gènes *glcAT-P* sur le plasmide pACT3 et *kfiD* sur le plasmide pBBR₃ après 24 heures d'induction. Un standard de lactose et de GlcA-Lac a été déposé.

Le lactose a été internalisé et transformé en GlcA-Lac, qui a été exporté dans le milieu extracellulaire. Aucun autre produit n'a été détecté dans les deux milieux, notamment aucune sur-production d'UDP-GlcA n'a été réalisée au cours de la culture. La consommation du lactose ainsi que sa transformation en GlcA-Lac n'ont pas été totales du fait que la culture de la souche ait été arrêtée après seulement 24 heures d'induction. Néanmoins la souche LB-11 s'est montrée capable de synthétiser du GlcA-Lac à partir de lactose sans accumulation de précurseur UDP-GlcA dans le milieu intracellulaire.

b) Biosynthèse du GlcA-Lac-Allyle

L'épitope HNK-1 a de nombreuses implications dans la régénération des cellules nerveuses et est notamment présents sur des glycoprotéines et des glycolipides. C'est pourquoi nous avons souhaité synthétiser des néoglycoprotéines porteuses d'épitope oligosaccharidique sulfatés, qui pourront être utilisées lors de possibles tests biologiques concernant la régénération des cellules nerveuses. Une stratégie de biosynthèse a été envisagée à partir d'accepteurs fonctionnalisés, porteurs à leur extrémité réductrice d'un groupement activable allylique permettant un greffage d'un oligopeptide ou d'une protéine par couplage par amino-réduction.

Des travaux réalisés par notre équipe ont démontré que l'accepteur fonctionnalisé Lac-Allyle était pris en charge par la lactose perméase LacY qui permettait un transport du Lac-allyle à l'intérieur de la cellule bactérienne où il peut être glycosylé (Fort, 2005). Dans notre stratégie d'essais de sulfatation par la HNK-1ST chez *E.coli*, la production du GlcA-Lac-Allyle, l'accepteur de sulfatation, a pu être réalisée (fig 31).

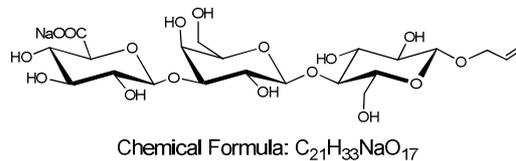


Figure 31: structure du motif oligosaccharidique GlcA-Lac-Allyle, précurseur non sulfaté de l'analogue de l'épitope HNK-1

Pour cela une culture de 200 mL de la même souche LB-10 que précédemment utilisée avec du lactose, a été réalisée dans les conditions standards à partir de 2.5 g/L de Lac-Allyle initial et une alimentation en glycérol 50%. Après 30 heures de production, la culture a été arrêtée sans problème de croissance détectée, et une analyse par CCM a été réalisée (fig 32).

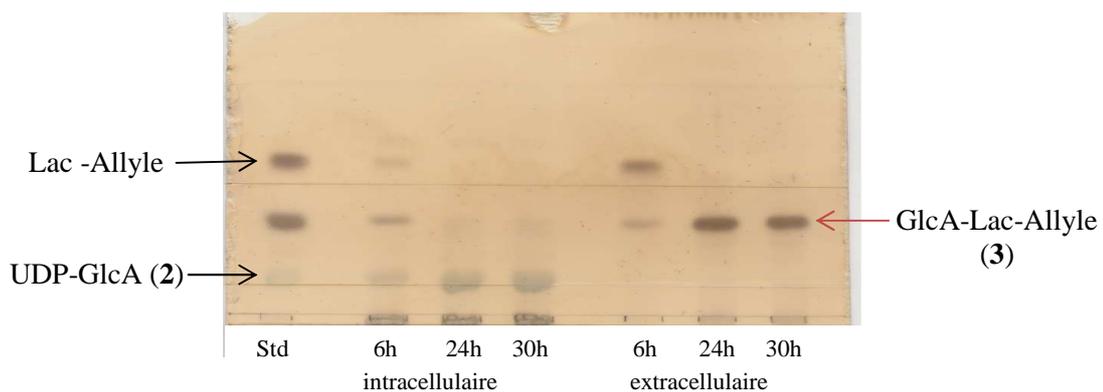


Figure 32: chromatographie sur couche mince des fractions extracellulaires et intracellulaires issues de la culture de la souche LB-10, surexprimant les gènes *glcAT-P* et *kfiD* à partir du Lac-Allyle à différents temps de production : +6 heures après induction, +24 heures et +30 heures ; le standard est composé de Lac-Allyle, GlcA-Lac-Allyle et UDP-GlcA.

L'accepteur Lac-Allyle disparaissait totalement du milieu extracellulaire au profit de son internalisation dans le milieu intracellulaire. La formation d'un produit **3** majoritaire dans la fraction extracellulaire et d'un produit **2** majoritaire dans la fraction intracellulaire ont été détectées. Le produit **2** a été identifié comme l'UDP-GlcA. Pour caractériser le produit **3**, sa purification a été réalisée par le protocole de purification des oligosaccharides chargés.

Une purification des milieux extra- et intracellulaires a donc été réalisée de manière à purifier et dessaler le produit **3**, et pour notamment éliminer l'UDP-GlcA. Une première purification des oligosaccharides chargés grâce à une résine échangeuse d'anions Dowex 1x4 sous forme HCO_3^- a été réalisée sur les deux fractions séparément. Une analyse par CCM des fractions éluées au cours de cette purification a été réalisée (fig 33).

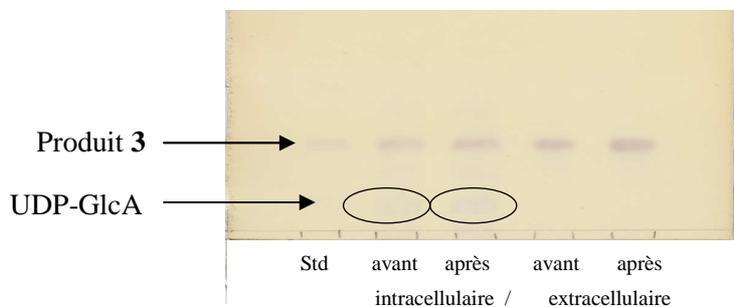


Figure 33 : chromatographie des fractions avant et après passage sur la colonne remplie de résine Dowex 1x4 (HCO_3^-) lors de la purification par chromatographie d'échange d'ions des fractions intra – et extracellulaire de la culture de la souche LB-10 à partir du Lac-Allyle. Un standard GlcA-Lac-Allyle a été déposé.

Le produit **3** a été retenu sur la résine échangeuse d'anion et a été élué grâce au bicarbonate de soude 0.5M. Ce résultat indiquait que le produit **3** était chargé négativement et pouvait donc correspondre au GlcA-Lac-Allyle. Cependant, la purification du produit **3** de la fraction intracellulaire n'avait pas eu lieu, l'UDP-GlcA était toujours présent. L'UDP-GlcA, composé porteur d'un résidu GlcA et chargé négativement, a été élué par un gradient 0-1M de bicarbonate de soude en même temps dans les fractions contenant le produit **3**.

Autre problème important rencontré au cours de cette purification, une partie des oligosaccharides chargés n'était pas retenue par la colonne ; les fractions non retenues par la résine Dowex 1x4 (FNR) lors de la charge des fractions intra- et extracellulaire sur la colonne ont été analysées par CCM (fig 34).

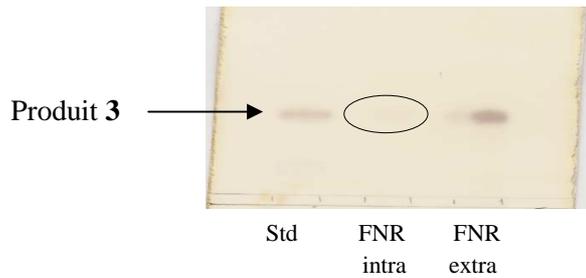


Figure 34 : chromatographie des fractions non retenues (FNR) par la résine Dowex 1x4 (HCO_3^-) lors de la purification par chromatographie d'échange d'ions des fractions intra – et extracellulaire de la culture de la souche LB-10 à partir du Lac-Allyle. Un standard GlcA-Lac-Allyle a été déposé.

Une partie du produit **3** s'était retrouvé dans les fractions non retenues par la résine, la colonne chargée en résine Dowex 1x4 sous forme HCO_3^- ne retenait donc pas tous les oligosaccharides chargés. La capacité de la résine était pourtant suffisante pour retenir plusieurs grammes d'oligosaccharides chargés. Une seconde chromatographie échangeuse d'anions a été réalisée avec un volume de résine plus important mais une portion oligosaccharidique importante était toujours observée dans la fraction non retenue. Malgré une régénération complète de la résine, le problème persistait toujours.

Les fractions chargées sur la colonne contenaient toutes une forte concentration en sels ce qui pouvait perturber la rétention des molécules oligosaccharidiques chargées sur la résine et entraîner cette fuite au travers de la colonne. Une purification du produit **3** devait être réalisée autrement, notamment avec un dessalage préalable des fractions et/ou un changement de résine.

Une autre méthode de purification du produit **3** a été testée avec la fraction extracellulaire. Utilisée de façon habituelle avant la purification des oligosaccharides neutres, la méthode de dessalage sur charbon actif est très pratique, rapide et efficace. Ainsi le surnageant a été chargé sur du charbon actif. Après rinçage à l'eau distillée, une CCM de contrôle a été réalisée (fig 35).

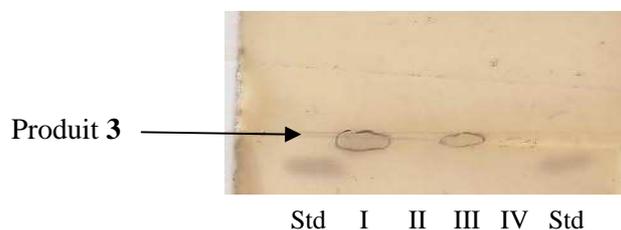


Figure 35 : chromatographie sur couche mince des fractions contenant les oligosaccharides avant passage sur charbon actif (I), de la fraction non retenue lors de la charge sur charbon (II), de la fraction correspondant au rinçage à l'eau distillée (III), et de la fraction correspondant à l'élution à l'éthanol 50% (IV) lors de la purification sur charbon actif du produit **3**. Le standard UDP-GlcA a été déposé.

Le produit **3** n'a pas été détecté dans la fraction II correspondant à la fraction non retenue sur le charbon, indiquant que le produit **3** a été retenu par le charbon actif. Cependant le produit **3** a été détecté dans la fraction III correspondant au lavage du charbon par l'eau distillée et très peu détecté dans la fraction IV correspondant à l'élution du charbon par l'éthanol 50%. Ces résultats indiquaient que le produit **3** a été élué en grande partie du charbon par de l'eau distillée. Cependant en s'éluant avec l'eau distillée, le produit **3** a été récupéré dans la même fraction que les sels minéraux, et donc le dessalage n'a pas été réalisé. Cette méthode de dessalage, très efficace pour des oligosaccharides libres non fonctionnalisés en position anomérique, ne semblait pas capable de dessaler efficacement une solution contenant des oligosaccharides fonctionnalisés. Les présences de la fonction allyle en position anomérique ou de la charge négative pouvaient perturber l'adsorption du produit **3** sur le charbon actif. La purification de ce composé a été continuée néanmoins par une chromatographie par échange d'ions.

La résine Dowex 1x4 (HCO₃⁻) précédemment utilisée s'était révélée peu efficace pour une purification du produit **3** car elle ne retenait pas les oligosaccharides chargés. Une autre résine de plus forte affinité a été utilisée ; Une partie du produit **3** (540 mg) issue de la fraction extracellulaire a été purifiée par chromatographie d'échange d'anion grâce à la résine DEAE A25 sous forme AcO⁻ (fig 36).

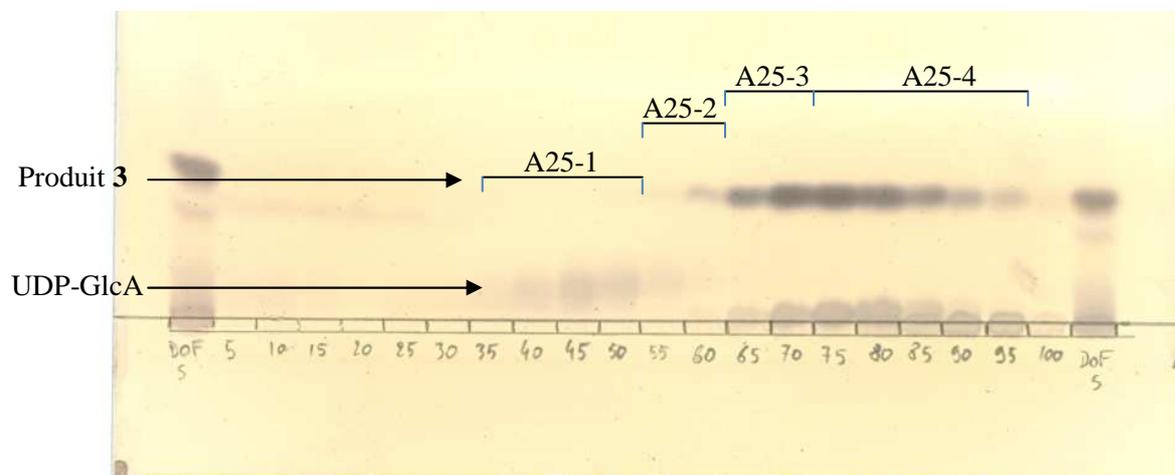


Figure 36 : Chromatographie sur couche mince des fractions élués au cours de la purification de la fraction extracellulaire de la culture de la souche LB-10 à partir du Lac-Allyle sur une colonne de résine DEAE A-25 (AcO⁻) avec une élution grâce à un gradient de AcONa (0-1M).

Des fractions non pures (A25-2) et pures (A25-3 et A25-4) contenant le produit **3** ont été récoltées après élution par un gradient AcO⁻ (0-1 M), la fraction A25-1 contenait de l'UDP-GlcA. Même si cette purification a été efficace pour séparer les composés entre eux, les fractions A25-3 et A25-4 ont été éluées avec du AcONa de 0.3M à 0.8M. Un dessalage était nécessaire.

Une autre méthode de purification utilisée est la chromatographie par perméation sur gel qui sépare les molécules en fonction de leur taille. Une partie (2 ml) de chaque fraction A25-2, A25-3 et A25-4 a ainsi été purifiée par GPC sur une colonne de gel HW40 avec une élution à l'eau distillée (fig 37).

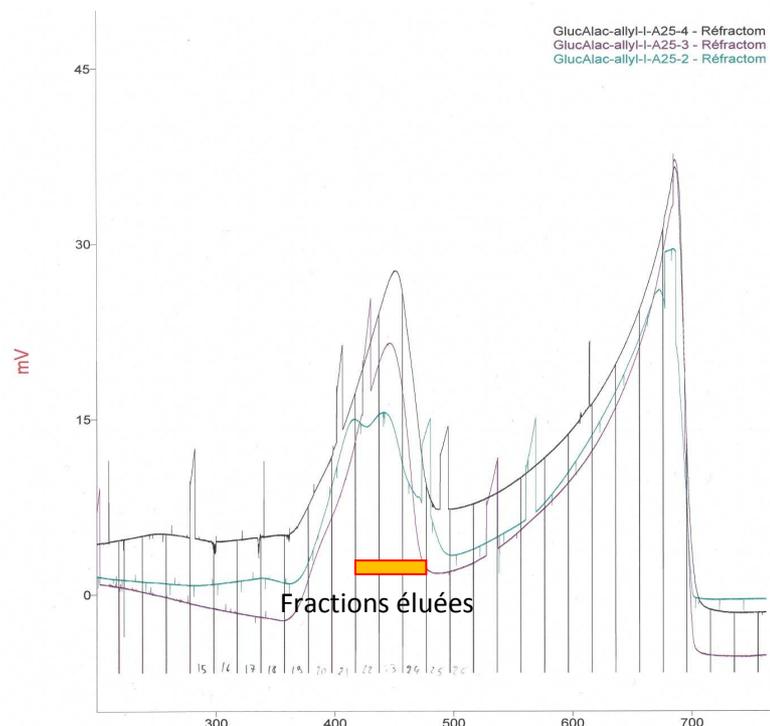


Figure 37 : purification par chromatographie d'exclusion sur gel HW40 du produit **3** des fractions non pures A25-2 et pures A25-3 et A25-4 issues de la purification par chromatographie échangeuse d'ions sur DEAE A25.

Tous les sels ont été élués en fin de purification. A l'issue de l'élution, le produit **3** présent dans les tubes 22-23 et 24 de la fraction A25-4 a été rassemblé et analysé. Il s'agit du GlcA-Lac-Allyle. Ce produit a fait l'objet d'une analyse détaillée, en raison de son originalité et de la publication de sa synthèse (Bastide, 2010).

Ses caractéristiques sont les suivantes :

Pouvoir rotatoire : $[\alpha]_D^{20} -18.2$ (c 0.6, H₂O)

Assignements RMN du proton et du carbone : ¹H RMN (D₂O) δ 6.0 (m, 1H, OCH₂CH=CH₂); 5.39 (dd, 1H, J 1.5, 17 Hz, OCH₂CH=CH₂); 5.29 (d, 1H, J 10.5 Hz, OCH₂CH=CH₂); 4.68 (d, 1H, J 7.8 Hz); 4.54 (d, 1H; J 8 Hz); 4.51 (d, 1H; J 7.8 Hz); 4.40 (dd, 1H, J 5.5, 12.5 Hz, OCH₂C=CH₂), 4.24 (dd, 1H, J 6.5, 12.5 Hz, OCH₂C=CH₂), 4.20 (d, 1H, J 3 Hz), 3.99 (dd, 1H, J 2, 12.5 Hz), 3.83-3.51 (m, 12H), 3.42 (m, 1H); 3.35 (t, 1H, J 8.5 Hz)

^{13}C RMN (D_2O) δ 176.6; 133.9; 119.4; 104.3; 103.2; 101.7; 82.9; 78.9; 76.8; 75.9; 75.7; 75.4; 75.0; 73.8; 73.5; 72.4; 71.3; 70.8; 68.7; 61.7; 60.7

Masse haute résolution : HRMS (MALDI-TOF) Calculée pour $\text{C}_{21}\text{H}_{33}\text{NaO}_{17}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 603.1513
Trouvée 603.1495

La purification directe du GlcA-Lac-Allyle par perméation sur gel HW40 était la méthode la plus directe et la plus efficace (52% de rendement de purification) pour purifier l'oligosaccharide fonctionnalisé. Cependant cette technique ne permettait la purification que de centaine de mg de produit à la fois. Dans l'optique d'une production en grande quantité, le verrou de la durée de la purification devra être levé par une autre méthode. De plus les oligosaccharides visés seront sulfatés et donc multichargés négativement, ce qui pourra influencer positivement ou négativement sur les résultats de purification avec les méthodes déjà essayées.

Au final, la souche LB-10 est donc capable de synthétiser du GlcA-Lac-Allyle. Cependant à l'issue des 30 heures de production, tout le trisaccharide formé est exporté hors de la cellule ce qui exclu toute sulfatation enzymatique.

Une biosynthèse de l'accepteur GlcA-Lac-Allyle par la souche HN7, surexprimant les gènes *glcAT-P* et *kfiD* sur le plasmide pBlueScript (Yavuz, 2008), a été réalisée à partir de Lac-Allyle et une alimentation en glucose 50%. Après 46 heures de production sans problème, la souche HN7 a également synthétisée du GlcA-Lac-Allyle mais sans sur-production d'UDP-GlcA (résultats non montrés).

2. Essais de sulfatation

Lors de la biosynthèse du motif HNK-1, la sulfatation est catalysée par la HNK-1ST. Contrairement aux glucuronyltransférases, il n'existe qu'un seul type de sulfotransférase impliquée dans la synthèse du HNK-1. Les gènes codant pour les sulfotransférases HNK-1ST de rat et d'humain ont été identifiés (Ong, 1998, Bakker, 1997). Par contre, peu d'études biochimiques ont été réalisées ; les domaines catalytiques exprimés dans des lignées cellulaires CHO sont capables de sulfater des accepteurs oligosaccharidiques synthétiques.

a) *HNK-1ST de Rattus norvegicus*

L'équipe de Bakker a décrit l'isolement de l'ADNc d'une sulfotransférase de rat. L'enzyme clonée est capable de synthétiser les structures connues du HNK-1 sur les glycolipides et glycoprotéines (Chou, 1986). L'enzyme exprimée chez des CHO comme une protéine de fusion soluble (en Nt) avec la protéine A pouvait transférer un sulfate provenant d'un donneur de sulfate aux substrats accepteurs contenant un terminal d'acide glucuronique (Bakker, 1997).

Pour réaliser nos essais de sulfatation *in vivo*, nous avons cloné le même gène de *Rattus norvegicus* encodant la HNK-1ST à partir de cDNA de cerveau de rat. Pour une expression active de la protéine soluble dans le cytoplasme des bactéries, la région transmembranaire de 17 acides aminés (WLLLAACFWVIFMFMVA) a été supprimée.

Le plasmide d'expression pBBR-*hnk1STrM* a été co-transformé avec le plasmide pBS-*glcAT-kfiD* dans une souche d'*E.coli* ZW et la souche LB-02 a été obtenue.

La culture d'1L de la souche LB-02, surexprimant les gènes *glcAT-P*, *kfiD* et *hnk-1STr*, a été réalisée dans les conditions standards à partir de 5 g/L de lactose et une alimentation en glycérol 50%. Après 44 heures de production, la culture a été arrêtée sans problème de croissance observé. Une analyse par CCM des fractions intracellulaires et extracellulaires recueillies au cours de la culture a été réalisée (fig 38).

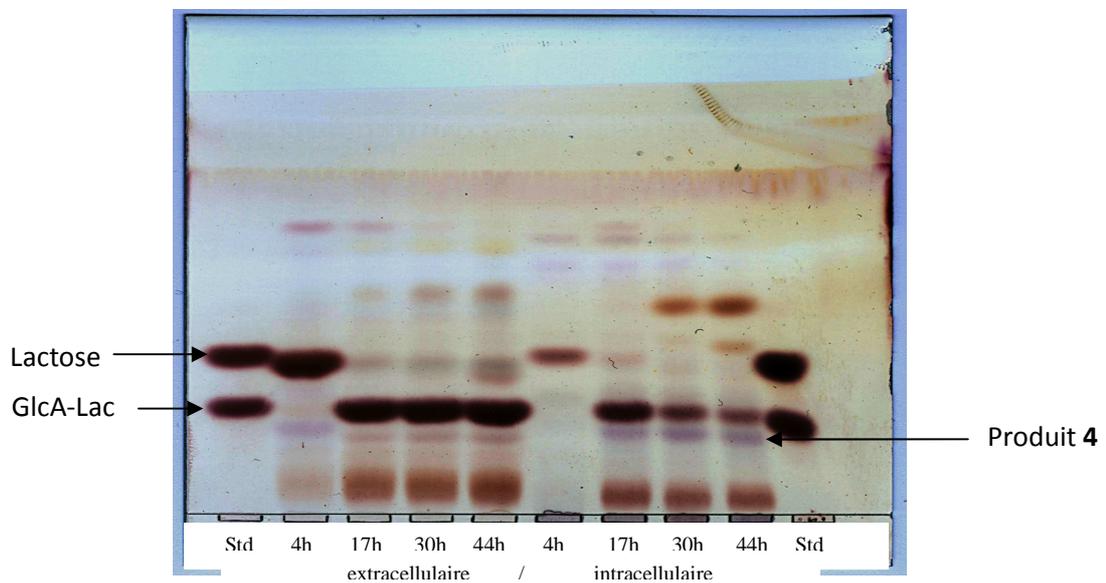


Figure 38 : chromatographie sur couche mince des fractions extracellulaire et intracellulaire issues de la culture de la souche LB-02, surexprimant les gènes *glcAT-P* et *kfiD* dans le plasmide pBlueScript et *hnk-1STr* dans le plasmide pBBR₃, à partir du lactose à différents temps de production : +4 heure après induction, +17 heures, +30 heures et +44 heures; des standards de lactose et GlcA-Lac ont été déposés.

Le lactose a été consommé totalement au terme de la culture et a été transformé en produit GlcA-Lac dans le milieu intracellulaire puis externalisé et accumulé dans le milieu extracellulaire. Un nouveau produit **4** apparaissait dans le milieu intra et extracellulaire candidat possible de l'action de la sulfotransférase. Pour identifier ce produit **4** plus facilement, une purification des oligosaccharides chargés du milieu intracellulaire a donc été réalisée. Une analyse par CCM a été réalisée à l'issue des différents passages sur résines (fig 39).

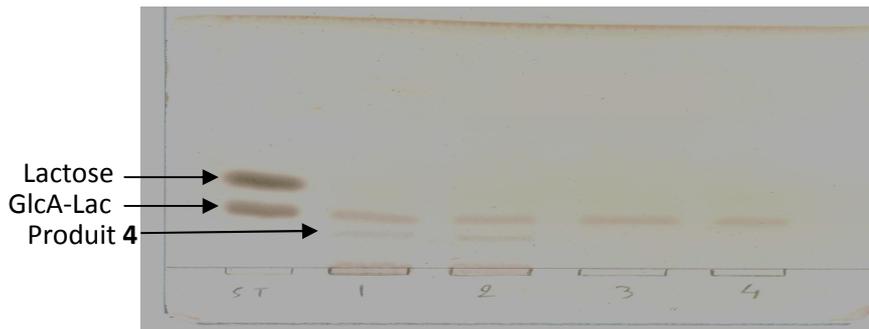


Figure 39 : chromatographie sur couche mince des différentes fractions obtenues lors de la purification des oligosaccharides chargés de la fraction intracellulaire de la culture de la souche LB-02, surexprimant les gènes *glcAT-P*, *kfiD* et *hnk-1ST*. Un standard de lactose/GlcA-Lac a été déposé ; L'échantillon 1 était la fraction intracellulaire finale chargée avant purification, l'échantillon 2 était la fraction éluée après le passage sur la résine IR120 H⁺, l'échantillon 3 était la fraction éluée après le passage sur la résine Dowex 1x4 sous forme Cl⁻ et l'échantillon 4 était la fraction éluée après le passage sur la résine Dowex 66 sous forme OH⁻.

Le produit **4** n'était plus présent dans la fraction d'éluion après le passage sur la résine Dowex 1x4 sous forme Cl⁻. Notre produit **4** était accroché à la résine et donc chargé négativement. Une éluion directe de la résine avec un gradient discontinu de bicarbonate de sodium (0M, 0.1M, 0.25M, 0.5M et 1M) a permis d'isoler une fraction de produit **4** pur, qui a été analysée par spectrométrie de masse basse résolution (fig 40).

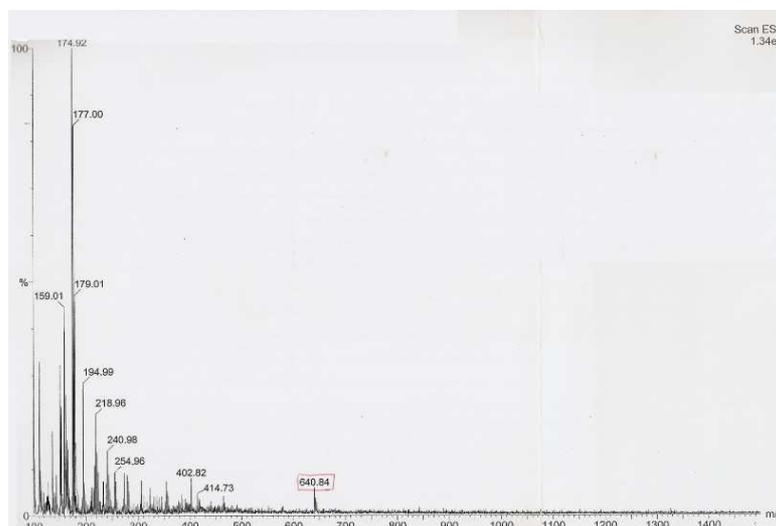


Figure 40 : spectre de masse en mode ESI négatif du produit **4** purifié de la fraction intracellulaire de la culture de la souche LB-02, surexprimant les gènes *glcAT-P*, *kfiD* et *hnk-1ST*, à partir du lactose.

Sur le spectre du produit **4**, un pic moléculaire à la masse $m/z = 640.84$ pourrait correspondre à un produit $[M-3H+2Na]^-$ avec une masse de 597.84 g/mol. Le produit sulfaté attendu Sulfo-GlcA-Lac possède une masse moléculaire calculée de 598.48 g/mol. Le produit **4** pourrait donc correspondre

au produit sulfaté attendu, indiquant que la souche LB-02, sur-exprimant la HNK-1ST de rat, serait capable de sulfater l'accepteur GlcA-Lac. Une analyse plus avancée de ce produit est cependant nécessaire pour confirmer ce résultat, non réalisée actuellement par manque de produit.

Afin d'améliorer l'activité de sulfatation de la HNK-1 de rat, une augmentation de la production du donneur de sulfate, le PAPS, a été tentée grâce à la sur-expression des gènes responsables de la biosynthèse de PAPS chez *R.meliloti*. Pour la synthèse et la régénération du PAPS, deux enzymes sont souvent surexprimées : une ATP sulfurylase et une APS kinase. Chez *R. meliloti*, les gènes *nodPQH*, indispensables pour la sulfatation des lipochitooligosaccharides (Roche., 1991), encodent cette ATP sulfurylase et cette APS kinase (Schwedock, 1990). Nous avons donc cloné les gènes *nodPQ* de *R.meliloti* sur le plasmide d'expression pBBR₃ à faible nombre de copie. Nous avons également cloné le gène *hnk-1STr* sur un plasmide d'expression à plus grand nombre de copies pACT₃. Ces deux plasmides ont été co-transformés avec le plasmide pBS-*glcAT-kfiD* dans une souche ZW pour former la souche recombinante LB-03.

Plusieurs cultures de 1L de la souche LB-03 ont été réalisées dans les conditions standards avec 5 g/L de lactose comme accepteur initial et du glycérol 50%. Après une bonne croissance de la souche en milieu riche LB 2% Glc (préculture), les cultures en milieu minimum de la souche LB-02 présentaient une croissance très faible dans le meilleur cas, parfois une mortalité.

Les problèmes de croissance des souches semblaient coïncider avec l'induction des gènes. La surexpression de *nodP* et *nodQ* pouvaient donc entraîner une production de PAPS qui semblait responsable de la mortalité des bactéries. Il faut souligner que le nombre de copies de *nodPQ* chez *R. meliloti* est de deux, alors que le nombre de copies du plasmide pBBR est d'environ 30. Il est communément admis qu'une accumulation de PAPS chez *Escherichia coli* entraîne une toxicité (Neuwald, 1992).

L'expression du gène *hnk-1STr* sur le plasmide pBBR3 s'étant révélée peu efficace pour la sulfatation de l'accepteur GlcA-Lac, celui-ci a été cloné directement en amont du gène *glcAT-P* sur un plasmide d'expression pBlueScript à grand nombre de copies et sous le contrôle d'un promoteur Ptac. Le plasmide obtenu pBS-*hnk1STr-glcAT* a été transformé dans la souche ZW pour former la souche LB-05.

La culture d'1L de la souche LB-05 a été réalisée dans les conditions standards de fermentation avec 2.5 g/L de lactose comme accepteur initial et du glycérol 50%. Après 28 heures de production sans problème, la culture a été arrêtée. D'après l'analyse par CCM, le lactose initial a été internalisé dans les cellules et transformé en GlcA-Lac, exporté dans le milieu extracellulaire (résultats non montrés). Aucun autre produit n'a été détecté au cours de cette culture, la souche LB-05 ne semblait pas capable de sulfater l'accepteur GlcA-Lac.

Il semble donc que l'absence d'activité de la HNK-1ST de rat ne soit pas forcément liée à un problème d'expression. Un nombre croissant de rapports récents ont révélé l'existence de complexes de glycosyltransférases dans l'appareil de Golgi (de Graffenried, 2004), et certains de ces complexes permettaient aux enzymes d'avoir des activités catalytiques supérieures à celles des enzymes seules (Seko, 2005). Une équipe travaillant notamment sur l'épitope HNK-1, a démontrée une amélioration de l'expression de la HNK-1ST lorsqu'elle était produite en fusion avec la glucuronyltransférase *glcAT-P* ou *glcAT-S* (Morita, 2008) (fig 41).

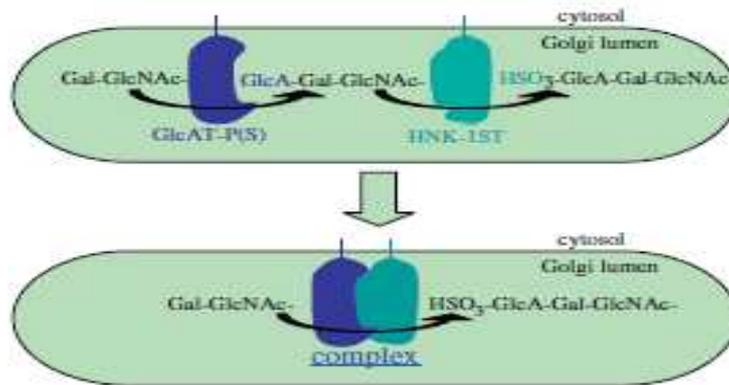


Figure 41 : diagramme schématique de la formation de complexe enzymatique entre une glucuronyltransférase (*GlcAT-P* ou *GlcAT-S*) et la HNK-1ST dans les cellules, résultant dans la biosynthèse efficace du glycanne HNK-1 (Morita, 2008).

Nous avons donc entrepris la réalisation de protéines de fusion. Ainsi la séquence codante de la partie catalytique du gène *hnk-1STr* de rat et le gène *glcAT-P* de souris ont été clonés sur le même plasmide pBlueScript selon deux stratégies de clonage différentes. Les plasmides pBS-*glcAT-hnk1STr* et pBS-*hnk1STr-glcAT* ont été obtenus et étaient responsables respectivement de la production des deux protéines de fusion PFI *GlcAT-HNK1ST* et PFII *HNK1ST-GlcAT*. Ces deux plasmides ont été respectivement transformés dans la souche ZW pour former les souches LB-08 et LB-09.

Parallèlement, les cultures de 200 mL de la souche LB-08 et LB-09 ont été réalisées dans les conditions standards à partir de 5 g/L de lactose et une alimentation en glucose 50%. Après 10 heures et 12 heures d'induction, les cultures des souches ont été arrêtées à cause d'une absence de croissance des souches. Les cultures des souches ZW-pBS-*hnk1STr-glcAT* et ZW-pBS-*glcAT-hnk1ST* semblaient poser un problème de croissance après induction des gènes. La production des protéines de fusion pouvait être la cause de cette mauvaise croissance. Aucune étude plus poussée n'a été effectuée pour identifier ce problème.

b) *HNK-1ST* humaine synthétique

Aucune sulfatation n'a été confirmée avec la HNK-1ST de rat sur un motif *GlcA-Lac*. Une analyse de la prédiction de la séquence codante chez *E.coli* de la HNK-1ST de rat a été révélée la

présence de 45 codons rares. Or la présence de codons rares, en groupes ou dans la partie N-terminale de la protéine comme c'était le cas pour la HNK-1ST, peut entraîner une diminution significative de l'expression d'une protéine hétérologue dans le système hôte spécifique. Le remplacement des codons rares par d'autres qui respectent mieux la préférence de codon du système hôte, sans modifier la séquence d'acides aminés, peut augmenter les niveaux d'expression de protéines fonctionnelles. C'est pourquoi nous avons choisi d'utiliser une séquence synthétique du gène *hnk-1ST*. Nous avons fait le choix d'utiliser la HNK-1ST humaine car il existe un anticorps disponible commercial pour cette enzyme. Cet anticorps Anti-CHST10 (SIGMA HPA012884) reconnaît une partie N-terminale (en gras, fig 42) de la HNK-1ST humaine. Il faut souligner que la séquence sauvage du gène humain présente également un grand nombre de codons rares pour une expression chez *E. coli*.

>gi|4758540|ref|NP_004845.1| HNK-1 sulfotransferase [Homo sapiens]

MHHQWLLLAACFWVIFMFMVAS**KFITLTFKDPDVYSAKQEFLLTTMPEVRKLPEE**
KHIPEELKPTGKELPDSQLVQPLVYMERLELIRNVCRDDALKNLSHTPVSKFVLDRIFVC
DKHKILFCQTPKVGNTQWKKVLIVLNGAFSSIEEIPENVVHDHEKNGLPRLSSFSDAEIQ
KRLKTYFKFFIVRDPFERLISAFKDKFVHNPRFEPWYRHEIAPGIIRKYRRNRRTETRGIQFEDFV
RYLGDPNHRWLDLQFGDHIHWVTVYELCAPCEIMYSVIGHHETLEDDAPYILKEAGIDHLVS
YPTIPPGITVYNRTKVEHYFLGISKRDIRRLYARFEGDFKLFQKPDFLLN

Figure 42: Séquence d'acides aminés déduite du gène *hnk-1ST* humain. En vert la partie génique synthétique correspondant à la tige et au domaine catalytique, en rouge le signal transmembranaire supprimé, en gras la partie N-terminale reconnue par l'anticorps anti-CHST10.

L'expression de la séquence codante pour la tige et le domaine catalytique de la HNK-1ST humaine a permis la sulfatation *in vivo* de glycoprotéines et de glycolipides, notamment un précurseur GlcA β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-octyl en position du carbone C-3 de la N-acétyllactosamine pour former un conjugué sulfo-3GlcA β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-R (Kizuka, 2006).

Ainsi la même séquence codante, correspondant à l'expression de la tige et du domaine catalytique du gène *hnk-1ST* humain, a été synthétisée. D'origine eucaryote, la séquence codante correspondant au domaine transmembranaire de la protéine a été supprimée pour permettre sa production dans le cytoplasme de la bactérie.

i. Essai de sulfatation sur le GlcA-Lac

Un essai de sulfatation avec la ST (synthétique) humaine a été réalisé dans les mêmes conditions que celle de rat. Le plasmide pUC-*hnk-1STs* a été co-transformé avec le plasmide pACT-*glcAT* et le plasmide pBBR-*kfiD* dans une souche ZW. Ainsi la souche obtenue LB-17 (ZW-pACT-*glcAT*-pBBR-*kfiD*-pUC-*hnk1STs*) devait permettre la production de l'épitope HNK-1 à partir de lactose.

La culture de 200 mL de la souche LB-17 a été réalisée dans les conditions standards avec 2.5 g/L de lactose et une alimentation glucose 50%. La culture de la souche a été arrêtée après 40 heures de production sans problème de croissance détecté. Une analyse par CCM a été réalisée sur les fractions intra- et extracellulaires finales (fig 43).

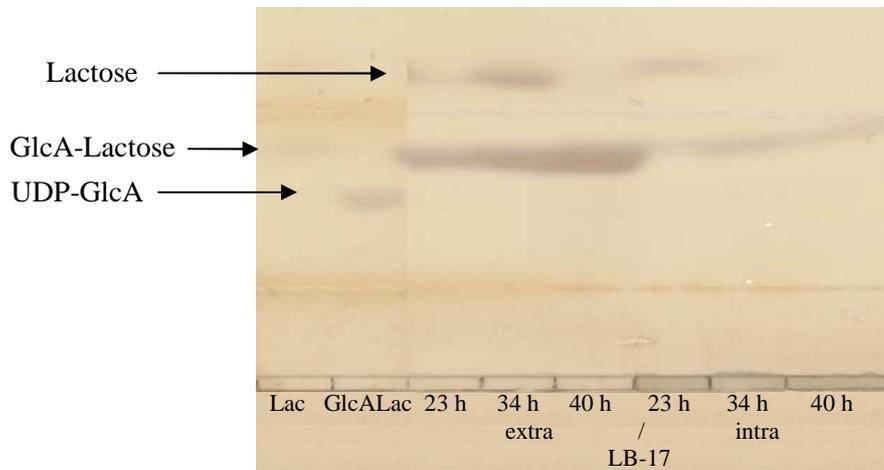


Figure 43 : chromatographie sur couche mince des fractions intra- et extracellulaires issues de la culture de la souche LB-17, surexprimant les gènes *glcAT*, *kfiD* et *hnk1STs*, après 23 heures 34 heures et 40 heures de production à partir du lactose. Des standards lactose, GlcA-Lac et UDP-GlcA ont été déposés.

Le lactose n'a pas été totalement consommé mais néanmoins du GlcA-Lac a été produit dans le milieu intracellulaire avant d'être exporté et accumulé dans le milieu extracellulaire en fin de culture. Malheureusement aucun autre produit n'a été détecté à l'issue de cette culture. La souche LB-17 ne synthétisait pas de produit sulfaté malgré la disponibilité de l'accepteur de sulfatation. Même s'il est probable que ce résultat soit lié à un problème d'expression sous une forme active, il ne peut être exclu que cette ST ne puisse pas sulfater le motif GlcA-lac, pour n'avoir été testée que sur l'accepteur GlcA β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-octyl. C'est peu probable, car une activité de sulfatation sur des oligosaccharides de type glycosaminoglycannes GlcA-Gal-Xyl a été montrée chez l'humain et il est probable que ce soit avec la même enzyme (Shibata et al, 2003).

ii. Fusion avec la GST

De nombreuses études ont montré une amélioration de l'expression et de la solubilité des protéines produites en fusion avec la Gluthation-SulfoTransférase (GST). C'est le cas de la HNK1-ST exprimée en fusion avec la protéine A dans des cellules COS. Le gène synthétique de la HNK-1ST a donc été cloné en aval du gène de la GST sur un plasmide pGEX, permettant la production de l'enzyme de fusion GST-HNK1ST.

Le plasmide pGEX-*hnk1STs* obtenu a été co-transformé avec le plasmide pACT-*glcAT-kfiD* dans une souche ZW. La souche LB-22 (ZW-pACT-*glcAT-kfiD*-pGex-*hnk1STs*) a été testée pour sa capacité à sulfater un motif GlcA-Lac.

La culture de 200 mL de la souche LB-22 a été réalisée dans les conditions standards avec 2.5 g/L de lactose et une alimentation glucose 50%. La culture de la souche a été arrêtée après 26 heures de production sans problème de croissance détecté. Une analyse par CCM a été réalisée sur les fractions intra- et extracellulaires finales (fig 44).

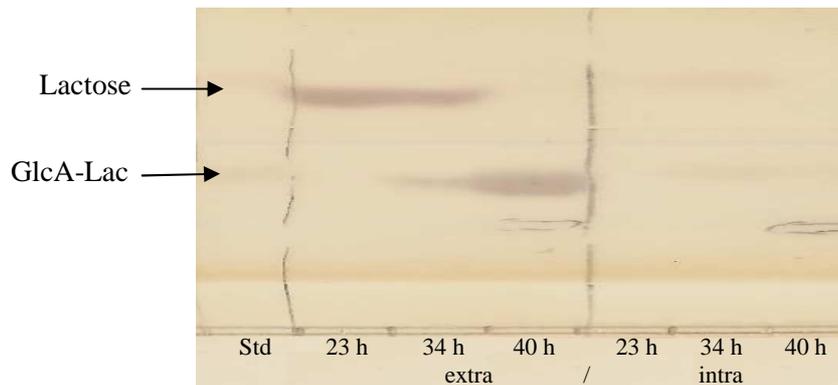


Figure 44 : chromatographie sur couche mince des fractions intra- et extracellulaires issues de la culture de la souche LB-22, permettant la production de la GlcAT, de KfiD et de la protéine de fusion GST-HNK1STs, après 23 heures, 34 heures et 40 heures de production à partir du lactose. Des standards GlcA-Lac et lactose ont été déposés.

Malgré une internalisation de l'accepteur lactose dans le milieu intracellulaire et la production de GlcA-Lac, aucun produit supplémentaire n'a été détecté. Aucune sulfatation n'a été détectée lors de la culture de la souche LB-22, indiquant que la production de la protéine de fusion entre la GST et la HNK-1STs n'a pas amélioré l'activité de la HNK-1STs sur un motif GlcA-Lac.

iii. Etudes de l'expression de la HNK-1ST humaine

Lors des essais de sulfatation avec la HNK-1ST d'origine humaine ou de rat, la production d'aucun produit sulfaté n'a été confirmée. L'expression de la HNK-1ST humaine en fusion avec la GST n'a pas permis de détecter une activité de sulfatation. La solubilité et l'activité de cette enzyme auraient dues être améliorées. Ces résultats avaient soulevé la possibilité que l'enzyme n'était peut-être pas produite, active ou non, ou pas accessible dans le cytoplasme de la bactérie. L'activité enzymatique de la HNK-1ST purifiée n'a pas été testée grâce à des tests d'activités *in vitro* sur des accepteurs par indisponibilité de certains produits (non commerciaux ou trop long à synthétiser) et par manque de temps.

Seule une étude de l'expression de l'enzyme HNK-1STs et de son éventuelle localisation chez la bactérie a été réalisée grâce à une détection de la production de l'enzyme par immunoblotting.

Les cultures des souches recombinantes d'*E.coli* déjà testées et permettant la production de l'enzyme HNK-1STs libre ou en fusion, ont été réalisées en milieu riche LB.

A la fin des cultures, la fraction des protéines solubles et la fraction des protéines insolubles ont été dénaturées et séparées par la méthode d'électrophorèse sur gel SDS-dénaturant (fig 45).

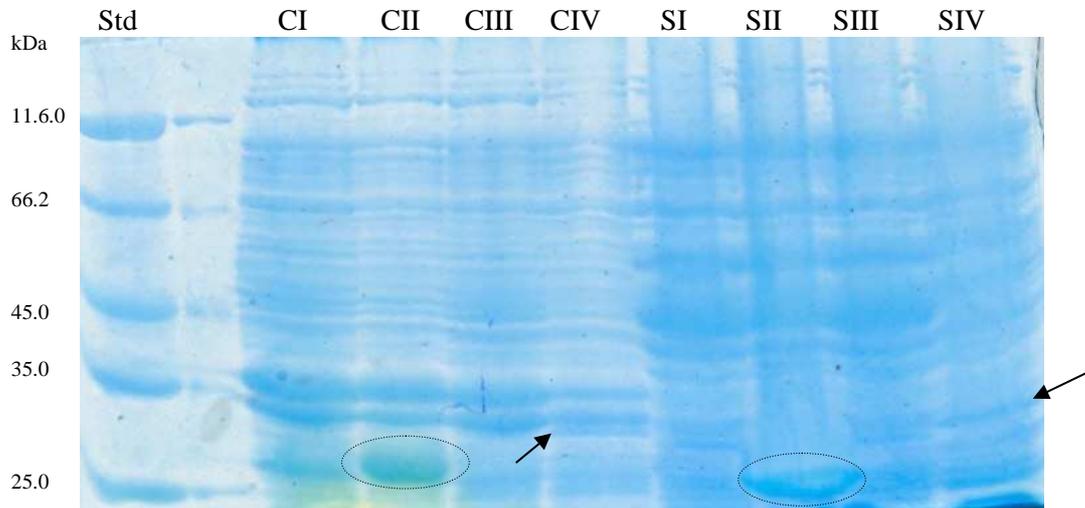


Figure 45: Gel SDS-PAGE réalisé à partir des fractions solubles (S) et insolubles (C) après lyse des bactéries issues des cultures des souches : I- souche ZW seule ; II- ZW-pGEX ; III- ZW-pGEX-*hnk1STs*-pACT-*glcAT-kfiD* ; IV- ZW-pUC-*hnk1STs*-pACT-*glcAT-kfiD*.

La culture de la souche I servait de référence pour la production de protéines endogènes de la souche ZW.

Lors de la culture de la souche II, une protéine inédite (encerclée fig 45) a été détectée dans les fractions solubles (SII) et insolubles (CII). La masse de cette protéine était d'environ 26 kDa. Chez *E.coli*, la Glutathion S-transférase GST est produite comme une protéine de masse 26 000 Da avec une activité enzymatique complète. L'expression de la GST a donc été réalisée activement chez *E.coli* par la souche ZW-pGEX. La détection de la GST dans la fraction soluble (SII) indiquait sa sur-production dans le milieu cytoplasmique, ainsi que sa solubilité. Cette enzyme a également été détectée dans la fraction insoluble (CII), probablement du fait d'une production très importante. L'enzyme GlcAT-P, surexprimée par la souche et démontrée active sur un accepteur, n'était pas pourtant visible sur le gel. Cela indiquait que la surproduction d'une enzyme n'est pas nécessaire à son bonne activité. Même produite à un niveau très faible, une enzyme peut avoir une activité catalytique importante.

Lors de la culture de la souche III, aucune protéine inédite n'a été détectée. La souche devait être capable de produire une protéine de fusion entre la GST et la HNK-1ST, possédant une masse de 63 400 Da. Aucune bande protéique unique à la culture de cette souche n'a été identifiée indiquant que la protéine de fusion GST-HNK-1ST n'a pas été produite.

Une protéine inédite (fléchée fig 45) à la culture de la souche IV a été détectée dans les fractions solubles (SIV) et insolubles (CIV). La masse moléculaire de cette protéine était de 33 kDa. Cette souche surexprimait le gène responsable de la synthèse de la HNK-1ST humaine, dont les prédictions de masse peptidique indiquaient une masse de 36 707 Da. La certitude qu'il s'agissait bien de la HNK-1ST n'était pas fournie par la simple analyse de ce gel.

L'un des avantages de l'utilisation de la HNK-1ST humaine était qu'il existe un anticorps monoclonal de souris anti-CHST10 qui reconnaît une séquence d'acides aminés précise dans la partie N-terminale de la HNK-1ST humaine.

Un WesternBlot (immunorévélation) a donc été réalisé avec cet anticorps primaire, ainsi qu'un anticorps secondaire de lapin couplé à la peroxidase.. Après transfert sur membrane de nitrocellulose et révélation, un gel de WesternBlot a été obtenu (fig 46).

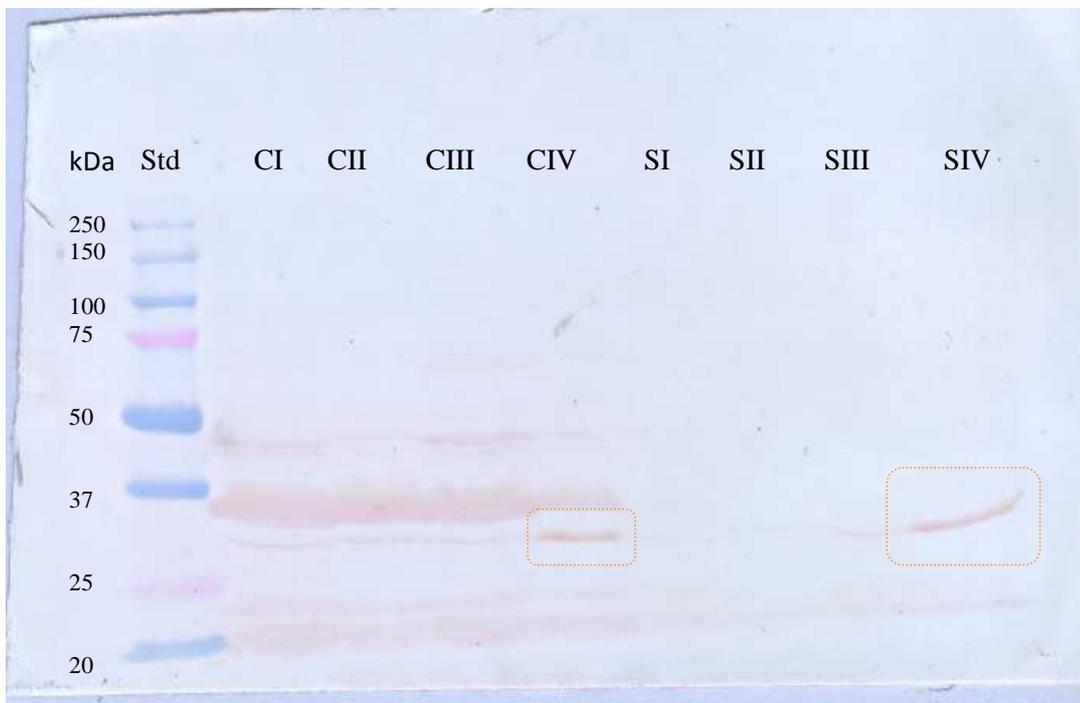


Figure 46 : Western Blot à partir des fractions insolubles (C) et solubles (S) après la lyse des bactéries issues des cultures des souches : I- souche ZW seule ; II- ZW-pGEX ; III- ZW-pGEX-*hnk1STs*-pACT-*glcAT-kfiD* ; IV- ZW-pUC-*hnk1STs*-pACT-*glcAT-kfiD*. La détection des protéines a été réalisée avec l'anticorps anti-CHST10, qui reconnaît la partie N-terminale de la HNK-1ST humaine.

On constate la présence d'une seule bande spécifique marquée, à la fois dans les fractions soluble et insoluble, confirmant la présence de la HNK-1ST humaine. La masse de cette protéine était de 33 kDa et correspondait à la même protéine que celle identifiée lors de l'analyse du gel de SDS-PAGE.

La souche ZW-pACT-*glcAT-kfiD-pUC-hnk1STs* était donc capable de produire la HNK-1ST humaine et que cette enzyme était produite dans le cytoplasme et soluble. Cependant la différence de masse de 4 kDa suggère une dégradation en partie C-terminale de la HNK-1ST, d'une trentaine d'acides aminés.

2. Biosynthèse du 6'sulfo sialylLewisX

1. Essais de sulfatation avec CHST4

Dans la nature, un motif sulfaté important est l'antigène Sulfo-SialylLewisX (sulfo-Le^X) qui présente de nombreuses activités biologiques. C'est un ligand des L-sélectines (en plus des E-sélectines), et joue un rôle au niveau de l'inflammation et du recrutement des lymphocytes T (Läubli, 2006). La sulfatation du motif sialyl-Lewis^X fait l'objet d'une complexité à la fois structurale et en terme d'expression *in vivo*. La forme de sulfatation la plus abondante est celle portant sur le résidu GlcNAc, c'est à dire le 6'-sulfo-sialyl-lewis^X (fig 47). L'étude de la spécificité des STs responsables de la sulfatation en 6 du résidu N-acétylglucosamine (GlcNAc6ST) a été la plus étudiée sur le plan biochimique.

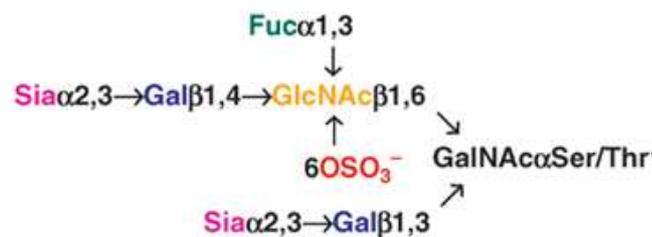


Figure 47 : structure du 6'-sulfo-sialyl-Lewis X

La synthèse de l'antigène LewisX (Le^X) par le procédé d'usine cellulaire a déjà été développée par notre équipe en utilisant le lactose comme accepteur (Dumon, 2006) par une souche surexprimant le gène *futA* d'*Helicobacter pylori* codant pour une α -3 fucosyltransférase, les gènes *lgtAB* de *Neisseria meningitidis* codant respectivement pour la β -3 GlcNAcT et la β -4 GalT et les gènes nécessaires à la formation du GDP-Fuc. La synthèse du motif sulfo-sLe^X nécessite ensuite une sulfatation puis une fucosylation comme indiqué dans la voie B de la figure 48.

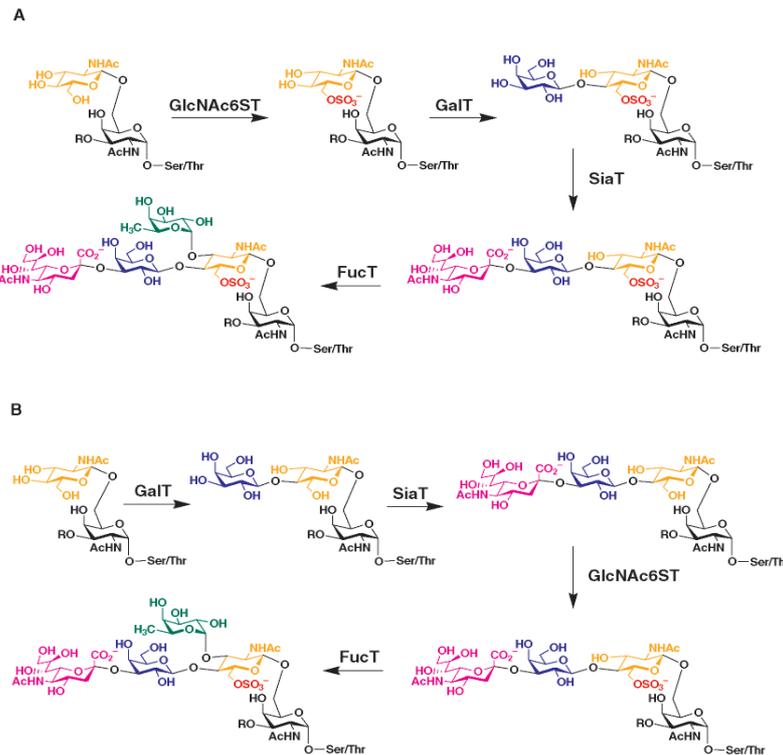


Figure 48 : Deux voies de biosynthèse possibles de l'assemblage des glycannes ligand des L-sélectines. (A) La sulfatation peut se produire sur le terminal résidu GlcNAc avant de poursuivre l'élaboration du glycanne par des glycosyltransférases. (B) L'ester de sulfate peut être ajouté après la galactosylation et la sialylation du résidu GlcNAc, mais avant la fucosylation. (Bowman, 2001).

Un travail portant sur la relation structure-spécificité d'accepteur a été réalisé dans le laboratoire de C. Bertozzi concernant la I-GlcNAc6ST (Bowman, 2001) (tab 8).

Substrate	GlcNAc6ST/CHST-2	HEC-GlcNAc6ST/LSST	I-GlcNAc6ST	CSST-2/GST5
1 Terminal GlcNAc	1.000	1.000	1.000	1.000
2 LacNAc	0.086	0.018	0.140	0.091
3 SiaLacNAc	0.031	0.234	0.751	0.164
4 sLex	0.010	0.054	0.069	0.011

Tableau 8: activités relatives de quatre enzymes possédant une activité GlcNAc-6-O-sulfotransférase envers différents substrats (1 mM), normalisées par rapport à l'activité relative sur le disaccharide 1 (Bowman, 2001).

Bien que la sulfotransférase de mammifère I-GlcNAc6ST (domaine catalytique) était une meilleure candidate pour la sulfatation sur le motif SiaLacNAc aussi bien que sur le LacNAc, permettant la biosynthèse du 6'-sulfo-sialyl-Lewis X indifféremment de la voie choisie, nous avons choisi d'exprimer le domaine catalytique du gène de la HEC-GlcNAc6ST chez *E. coli*. En effet parmi les 3 autres STs étudiées en même temps que la I-GlcNAc6ST, seule la HEC-GlcNAc6ST s'était montrée suffisamment active sur l'accepteur sialylé (siaLacNAc) pour rendre les deux voies de

biosynthèse du 6'-sulfo sialylLewis^X utilisables. Par ailleurs une légère activité a été trouvée sur l'accepteur sialyl Lewis^X (sLex) pour la HEC-GlcNAc6ST (tableau 8).

La séquence codante du domaine catalytique du gène *GlcNAc6ST* humain (*GST3*), codant pour la GlcNAc6ST-2 (ou HEC-GlcNAc6ST ou GST-3 ou CHST4 ou LSST), dépourvue du stem et du domaine transmembranaire, a été amplifiée. Nous avons appelé ce gène *chst4*. Le meilleur accepteur de sulfatation (GlcNAc-Lac) présentant un GlcNAc terminal a d'abord été utilisé pour tester la CHST4.

La souche ZW a été transformée avec la combinaison de plasmide pSU-*lgtA*, sur-exprimant le gène *lgtA* de *Neisseria meningitidis* encodant la β 1,3 N-acétylglucosaminyltransférase et le plasmide pBS-*chst4*, plasmide à nombre de copie élevé. Cette souche LB-04 devait permettre la biosynthèse du motif 6sulfo-GlcNAc- à partir du lactose.

La culture de 200 mL de la souche LB-04 a été réalisée dans les conditions standards avec 5 g/L de lactose et une alimentation en glc 50%. La culture a duré 42 heures sans problème de croissance. Une analyse par CCM a été effectuée en fin de culture (fig 49).

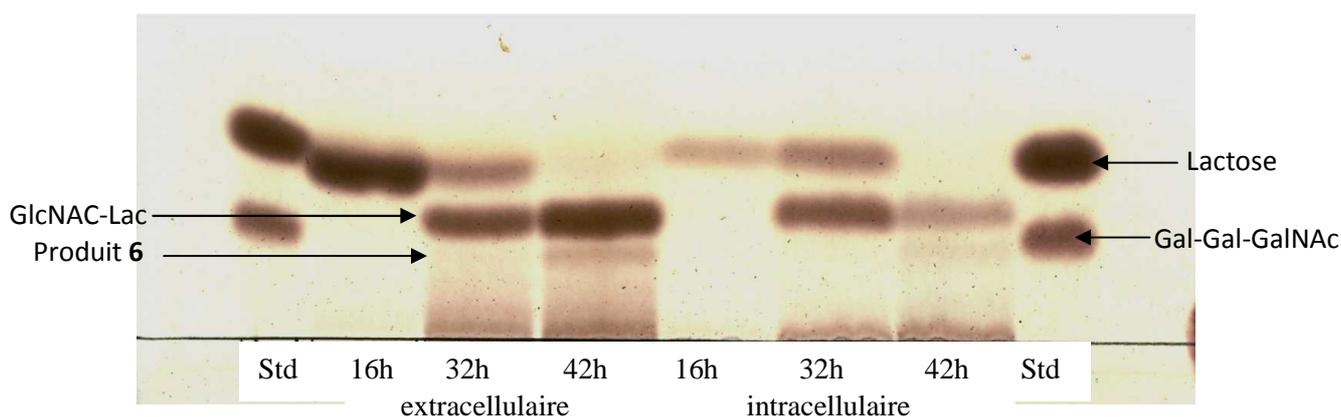


Figure 49 : chromatographie sur couche mince des milieux extracellulaire et intracellulaire issus de la culture de LB-04 surexprimant le gène *chst4*, codant pour la GlcNAc6ST-2 et le gène *lgtA*, codant pour la β -3GlcNActransférase, à partir de lactose à différents temps de production : 16 heures, 32 heures et 42 heures. Le standard déposé (Std) est un mélange de lactose et de trisaccharide Gal-Gal-GalNAc.

Le lactose a été accumulé dans les bactéries et a ensuite été totalement consommé. En parallèle, un premier composé a été produit dans les fractions intra- puis extracellulaires où il s'accumulait, ce produit a été identifié comme le GlcNAc-Lac. Le lactose avait donc été modifié en GlcNAc-Lac, témoignant de la bonne activité du gène *lgtA*.

En fin de culture, un second produit 6 semblait se former dans le milieu intracellulaire puis être exporté dans le milieu extracellulaire. Ce produit 6 présentait une migration plus faible sur la CCM que le trisaccharide et pouvait correspondre au trisaccharide sulfaté (fig 49).

Une purification du produit **6** a donc été réalisée pour l'identifier. Le milieu extracellulaire a été dessalé sur charbon actif puis purifié par chromatographie échangeuse d'anions avec une Dowex 1x4 (HCO_3^-) (fig 50).

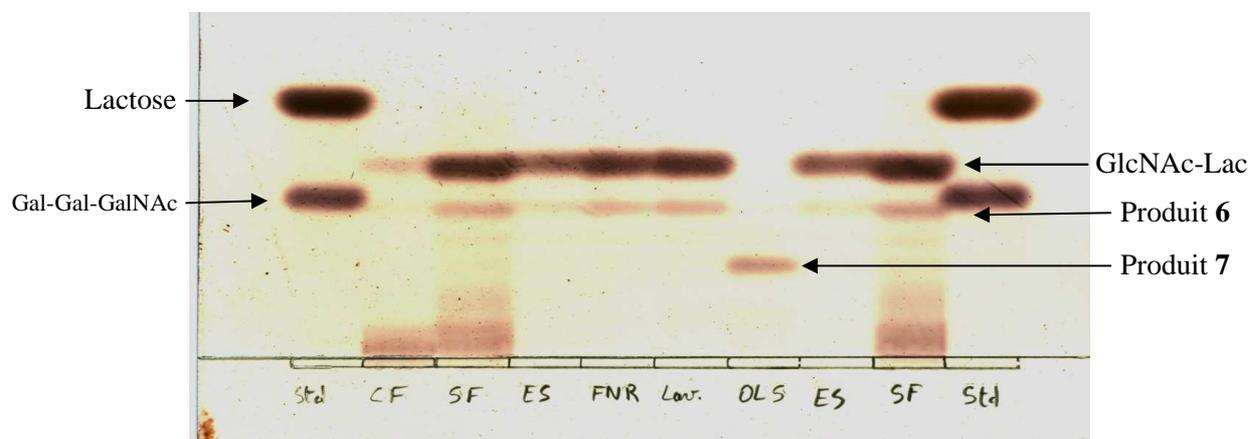


Figure 50 : chromatographie sur couche mince des différentes fractions issues de la culture de la souche LB-04. On observe les dépôts de la fraction intracellulaire finale (CF), de la fraction extracellulaire finale (SF), de la fraction extracellulaire éluée après le passage sur charbon (ES), de la fraction non retenue par la résine Dowex 1x4 (HCO_3^-) (FNR), de la fraction des lavages de la colonne à l'eau distillée (Lav.), de la fraction rassemblée de l'oligosaccharide élué (OLS) et du standard lactose/Gal-Gal-GalNAc.

Le GlcNAc-Lac et le produit **6** n'ont pas été retenus par la résine échangeuse d'anions, se retrouvant dans les fractions non retenues (FNR) et de lavage

L'éluion de la colonne, réalisée avec un gradient de bicarbonate de soude de 0 à 1M (fig 50), a permis la purification d'un nouveau produit **7** ($m = 34.6$ mg). Ce nouvel oligosaccharide chargé (noté OL7) a été analysé par spectrométrie de masse basse résolution (Fig 51).

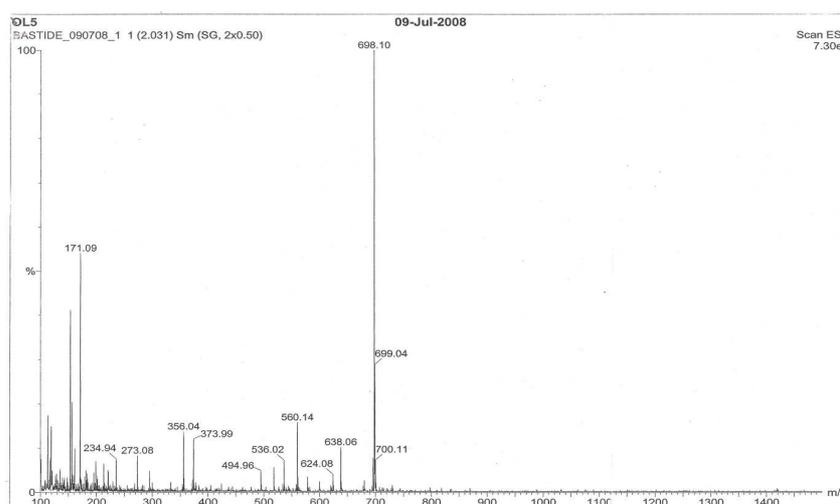


Figure 51 : Analyse par spectrométrie de masse en ionisation par électrospray en mode négatif de l'oligosaccharide OL7 purifié par chromatographie échangeuse d'anions de la fraction extracellulaire de la souche LB-04.

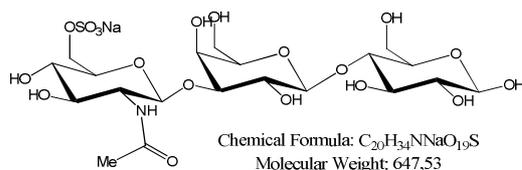


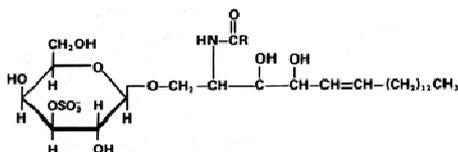
Figure 52 : Structure et masse moléculaire du trisaccharide sulfaté désiré 6-sulfo-GlcNAc-Lac.

Le spectre d'analyse l'oligosaccharide OL7 possédait un pic majoritaire à la masse $m/z=698.10$, ne correspondant pas à un pic moléculaire du trisaccharide chargé 6'-sulfo-GlcNAc-Lac, de masse moléculaire 625.55 g/mol. L'identification du produit OL7 n'a pas été finalisée. Cependant ce produit 7 n'avait pas été détecté durant la CCM du suivi de culture, indiquant une production très faible.

Le produit 6, écarté car non retenu par la résine échangeuse d'anions, n'a pas été caractérisé par manque de temps pour réaliser une autre production. Néanmoins le produit 6 peut s'avérer être un produit intéressant compte tenu des problèmes de purification rencontrés ultérieurement. Le produit 6, qui pourrait être le produit espéré, devra être produit en quantité plus importante pour pouvoir être caractérisé correctement.

3. Biosynthèse des sulfatides

Un autre glycanne sulfaté d'intérêt biologique est le motif 3-sulfate de galactosylcérobrosides (ou galactosyle céramide) dont la structure complète est la suivante :



Leurs biosynthèses dans le cerveau sont sous le contrôle de 3-sulfotransférases qui transfèrent un groupe sulfate en position C-3 d'un résidu galactose terminal. L'intérêt biologique de tels composés sulfatés et la possibilité de tester d'autres sulfotransférases dans le cadre de l'usine cellulaire chez *E.coli* ont stimulé les études de biosynthèse de ces glycannes sulfatés.

1. Essais de sulfatation avec la Rv1373 de *M.tuberculosis*

Parmi les gènes codant pour une 3-O-sulfotransférase capable de réaliser une telle sulfatation se trouve le gène *rv1373* de *Mycobacterium tuberculosis*, d'origine procaryote. L'équipe de Rivera-Marrero a cloné le gène *rv1373* (0.98 kb) par PCR et l'a exprimé sur un plasmide à grand nombre de copie pET23. La ST encodée a été exprimée dans des souches BL21(DE3) d'*E.coli* comme une protéine recombinante de fusion avec une queue poly-histidine (39 kDa). La protéine de fusion purifiée a démontré une activité de 3-O-sulfatation envers des substrats connus de STs eucaryotes de

glycolipides telles que des galactosylcéramides de type I et de type II qui présentent un motif galactosyle en position terminale (Rivera-Marrero, 2002).

Nous avons testé cette même activité de sulfatation de l'enzyme encodée par le gène *rv1373* pour la biosynthèse de galactosulfatides dans le cadre de l'usine cellulaire. Le gène *rv1373* a été cloné sur le plasmide d'expression pBlueScript KS, à grand nombre de copie et sous le contrôle d'un promoteur fort Plac. Le plasmide recombinant pBS-*rv1373* a été transformé dans la souche d'*E.coli* recombinante ZW pour donner la souche LB-07. Des cultures d'*E.coli* surexprimant le gène *rv1373*, codant pour la 3-galactosylcéramide sulfotransférase, ont été réalisées et différents substrats de sulfatation, à notre disposition, ont été testés. Tous présentaient un motif galactosyle terminal, seule la partie en position anomérique variait.

a) Sulfatation du Lac-Allyle

Le premier accepteur à avoir été testé fut le lactoside d'allyle. Présentant un motif galactosyle terminal, ainsi qu'une hydrophobicité apportée par le groupement allylique, ce motif ressemblait au motif accepteur naturel déjà testé.

Une culture de 1 L de la souche LB-07 a été réalisée dans les conditions standards avec 5 g/L de lactoside d'allyle comme accepteur initial et une alimentation en glycérol 50%. La culture a été arrêtée après 48 heures de production après un arrêt de la respiration des cellules, une baisse de respiration était observée dès la 33^{ème} heure de production. Une analyse par CCM (fig 53) a été réalisée sur les fractions intra- et extracellulaires en fin de culture.

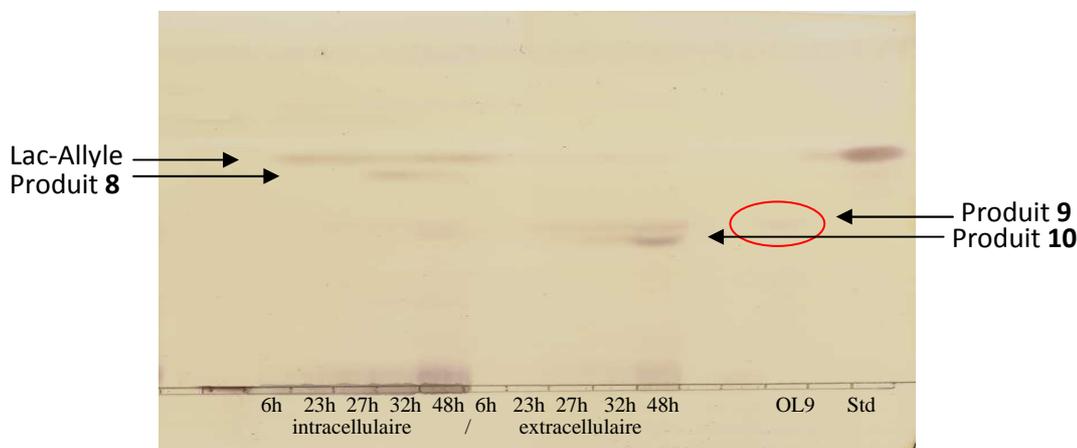


Figure 53 : chromatographie sur couche mince des fractions extracellulaires et intracellulaires issues de la culture de la souche LB-07, surexprimant le gène *rv1373*, à partir de lactoside d'allyle à différents temps de production : 6h, 23h, 27h, 32h et 48h (arrêt). Un standard lactoside d'allyle a été déposé.

A l'issue de la culture de la souche surexprimant le gène *rv1373* à partir de Lac-Allyle, le lactoside d'allyle a été internalisé et accumulé dans le milieu intracellulaire. Des oligosaccharides ont été produits au cours de cette culture. Dans le milieu intracellulaire, le composé **8** a été produit, il

présentait une migration sur CCM plus faible que le Lac-Allyle. Des oligosaccharides potentiellement modifiés **9** et **10** étaient également décelables dans la fraction intracellulaire et dans la fraction extracellulaire.

Seule la fraction intracellulaire a été soumise à une purification des oligosaccharides chargés grâce à la résine échangeuse d'anions Dowex 1x4 sous forme HCO_3^- , les oligosaccharides ont été élués grâce à un gradient de bicarbonate de sodium 0-1 M (fig 54).

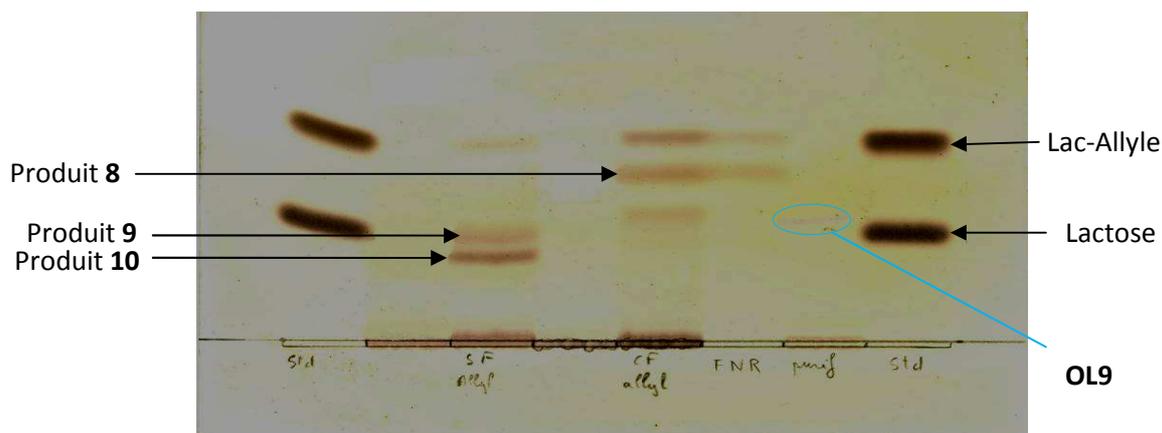


Figure 54 : chromatographie sur couche mince des fractions extracellulaires et intracellulaires finales issues de la culture de la souche LB-07, surexprimant le gène *rv1373*, à partir de lactoside d'allyle. La fraction non retenue (FNR) et le produit OL9 issu de la purification sur résine Dowex 1x4 sous forme HCO_3^- de la fraction intracellulaire ont été déposés, ainsi que des standards lactose et lactoside d'allyle.

Le composé **8** n'a pas été retenu par la résine et a été élué en même temps que le composé neutre non sulfaté Lac-Allyle dans la fraction non retenue FNR. L'oligosaccharide **8** n'était donc pas chargé négativement.

L'éluion a permis la purification d'un produit pur chargé **OL9** (m= 58 mg), le produit **10** n'a été élué et/ou détecté dans aucune des fractions. La fraction contenant le produit **OL9** a été caractérisée par spectrométrie de masse basse résolution (Fig 55).

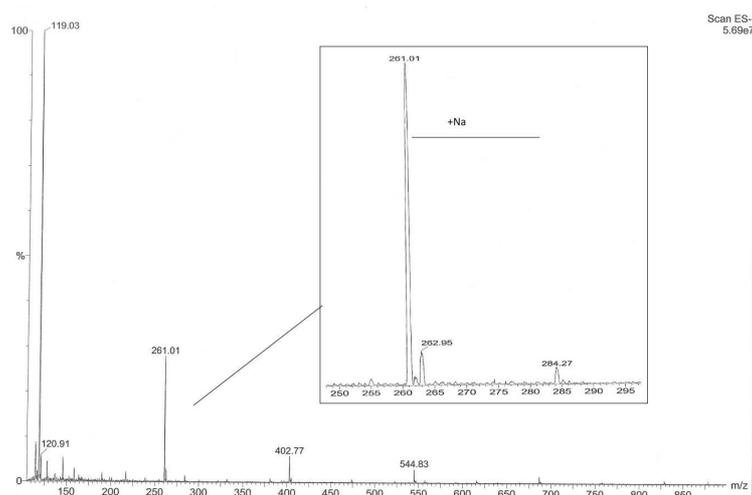


Figure 55 : analyse du spectre de masse du produit OL9 par spectrométrie de masse en électrospray en mode négatif dans l'eau.

Le spectre présentait des pics moléculaires $[M-1H]^-$ à la masse $m/z=119.03$, $[2M-2H+Na]^-$ à la masse $m/z=261.01$, $[3M-3H+2Na]^-$ à la masse $m/z=402.77$ et $[4M-4H+3Na]^-$ à la masse $m/z=544.83$ dont la molécule M avait une masse de 120.03 g/mol. Le pic moléculaire du produit attendu 3-sulfo-Lac-Allyle, de masse moléculaire de 462.42 g/mol, n'a pas été identifié.

La sulfatation de l'accepteur lactoside d'allyle n'a pas été réalisée par la ST encodée par le gène *rv1373* au cours de cette culture. Cependant le produit **OL9**, chargé négativement puisqu'il était issu de l'éluion d'une résine échangeuse d'anions, n'a pas été caractérisé.

Les analyses des spectres de masse des composés **9** et **10**, purifiés du milieu extracellulaire par CCM n'ont pas révélé la production d'oligosaccharides sulfatés (résultats non montrés). Les produits **9** et **10** restent non identifiés.

Pour surmonter un éventuel problème de manque de PAPS disponible dans la bactérie, les gènes *nodP* et *nodQ* ont été clonés sur un plasmide pACT₃ et ce plasmide recombinant a été transformé dans la souche LB-07 pour donner la souche LB-08. Cette souche surexprimait le PAPS et la ST devait être capable de sulfater plus facilement un motif lactoside d'allyle chez *E.coli*. Plusieurs cultures de 1 L de la souche LB-08 ont été réalisées dans les conditions standards avec 1 g de lactoside d'allyle et une alimentation en glycérol 50%. Comme précédemment (page 78), les cultures ont avorté probablement sous l'effet toxique d'une accumulation de PAPS. Aucune culture de la souche LB-08 d'*E.coli* qui surexprimait les gènes *nodP* et *nodQ* sous le contrôle du promoteur fort Plac n'a pu être réalisée.

b) Sulfatation du Lac-Propargyle

La présence de la fonction allyle pouvait perturber la liaison de l'accepteur lactoside d'allyle dans le site de liaison de la ST, empêchant la sulfatation du motif lactoside d'allyle. Un autre motif

lactoside fonctionnalisé a été testé : le lactoside de propargyle qui diffère seulement par la fonction propargyle en position anomérique et apporte une différence d'hydrophobicité qui pourrait améliorer la liaison de l'accepteur Lac-Prop dans le site de liaison de la ST.

Une culture de 1 L de la souche LB-07 a été réalisée dans les conditions standards avec 2.5 g/L de lactoside de propargyle comme accepteur initial et une alimentation en glycérol 50%. La culture a été arrêtée après 36 heures et une analyse par CCM a été réalisée sur les fractions recueillies au cours de la culture (fig 56).

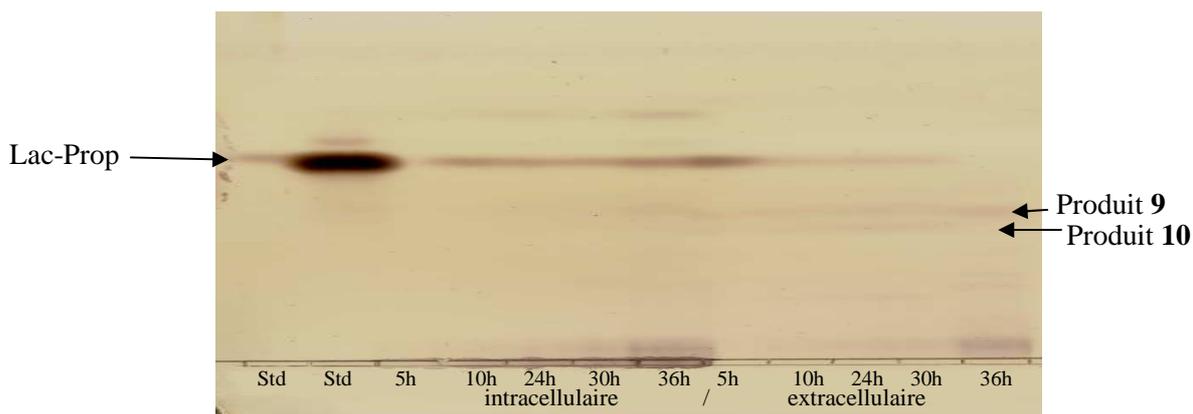


Figure 56 : chromatographie sur couche mince des fractions extracellulaires et intracellulaires issues de la culture de la souche LB-07, surexprimant le gène *rv1373*, à partir de lactoside de propargyle à différents temps de production : 5h, 10h, 24h, 30h et 36h (arrêt). Un standard de lactoside de propargyle a été déposé.

L'internalisation et l'accumulation du Lac-Prop dans le milieu intracellulaire a été réalisée, mais contrairement à la culture de la même souche à partir de Lac-Allyle, la production du composé **8** n' pas été observée. Cependant les composés **9** et **10** ont été produits dans les deux milieux. Ils ont été comparés par chromatographie sur couche mince aux produits **9** et **10** synthétisés au cours de la culture de la même souche à partir de lactoside d'allyle et ont été identifiés comme identiques (résultats non montrés). De nouvelles analyses de ces deux composés **9** et **10** n'ont pas révélées de structures sulfatées.

c) Sulfatation du Gal-Propargyle

Un troisième motif, le galactoside de propargyle, a été testé comme accepteur de sulfatation par cette ST. Ce motif monosaccharidique galactoside fonctionnalisé par le groupement propargyle ressemblait davantage aux accepteurs galactocéramides caractérisés de la sulfotransférase de par la nature hydrophobe du motif propargyle. Des tests de sulfatation grâce au plasmide pBS-*rv1373* ont été réalisés.

Une culture de 1L de la souche LB-07 a été réalisée dans les conditions standards avec 5g/L de galactoside de propargyle comme accepteur initial et une alimentation en glycérol 50%. Après 50 heures de production, la culture a été arrêtée et aucun problème de croissance n'a été observé. Une analyse par CCM (fig 57) a été réalisée sur les fractions collectées au cours de la culture.

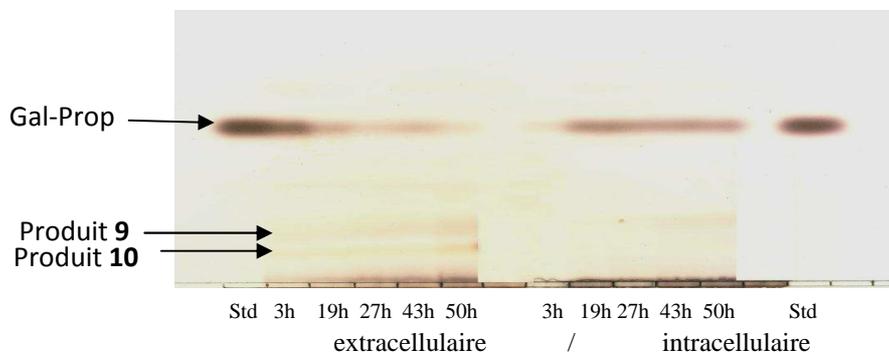


Figure 57 : chromatographie sur couche mince des fractions extracellulaires et intracellulaires issues de la culture de la souche LB-07, surexprimant le gène *rv1373*, à partir du galactoside de propargyle à différents temps de production : 3 heures, 19 heures, 27 heures, 43 heures et 50 heures (arrêt) ; un standard de galactoside de propargyle a été déposé.

L'accepteur Gal-Prop a été internalisé presque totalement et accumulé dans le milieu intracellulaire. Cependant aucun oligosaccharide modifié d'intérêt en quantité observable n'a été détecté. Comme lors de la culture à partir de lactoside d'allyle et de lactoside de propargyle, les composés **9** et **10** ont été produits dans la fraction intra et extracellulaire, sans être des composés sulfatés. Aucune sulfatation du motif Gal-Prop n'avait eu lieu. L'échec de la sulfatation de l'accepteur Gal-Prop pouvait venir du fait que ce n'est pas un motif Gal-céramide et/ou du fait que le galactose terminal sur cet accepteur était trop près de la triple liaison de la fonction propargyle. La spécificité de cette ST est liée au groupement céramide et donc l'enzyme doit posséder un site de liaison à ce groupement. Quand bien même le groupe propargyle se fixait bien dans ce site de liaison, le galactose terminal était peut-être trop loin du site catalytique pour être sulfaté.

d) Sulfatation de l'IPTG

Après les échecs de sulfatation de la ST encodée par le gène *rv1373* sur les motifs lactoside d'allyle, lactoside de propargyle et galactoside de propargyle, un dernier type d'accepteur de sulfatation a été testé. Le motif isopropyl β -1-thiogalactopyranoside (IPTG) est un composé sulfaté dérivé du galactose. Il est internalisé dans le milieu intracellulaire et non hydrolysable par les cellules bactériennes. De par la ressemblance de son cycle avec un résidu galactose, il représentait un bon accepteur potentiel de sulfatation.

Une culture de 200 mL de la souche LB-07 a été réalisée dans les conditions standards avec 7.5 g/L d'IPTG comme accepteur initial et une alimentation en glycérol 50%. La culture a été arrêtée après 50 heures de production sans aucun problème de croissance. Une analyse par CCM des fractions finales obtenues a été réalisée (fig 58).

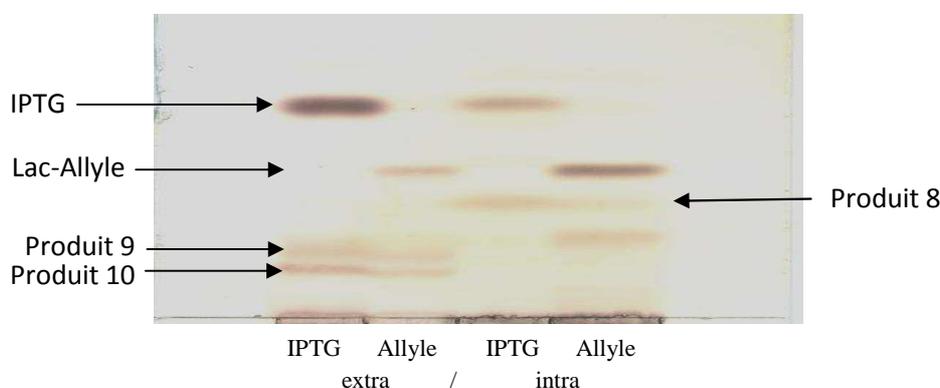


Figure 58 : chromatographie sur couche mince comparative des fractions intracellulaires et extracellulaires finales issues des cultures de la souche LB-07, surexprimant le gène *rv1373*, à partir de lactoside d'allyle et d'IPTG.

L'internalisation et l'accumulation de l'IPTG dans la fraction intracellulaire a été observée. L'accepteur potentiel de sulfatation n'avait pas été dégradé et était donc disponible. A l'issue de la culture de la souche à partir d'IPTG, les mêmes composés **8**, **9** et **10** ont été produits que lors de la culture de la même souche à partir de Lac-allyle. Ces composés n'ont pas été identifiés mais ne révélaient pas de composés sulfatés.

La production du composé **9** et du composé **10** était présente au cours de toutes les cultures de la souche LB-07 à partir de différents accepteurs. Les composés **9** et **10** devaient être des oligosaccharides synthétisés communs aux cultures à partir de lactoside d'allyle, de lactoside de propargyle, de galactoside de propargyle et d'IPTG.

Au final la souche LB-07 ne semblait pas capable de produire de nouveau motif modifié, impliquant une inactivité de la ST encodée par le gène *rv1373* à sulfater nos accepteurs oligosaccharidiques dans le cadre de l'usine cellulaire chez *E.coli*.

4. Biosynthèse de structures bactériennes

Au laboratoire, dans le cadre de la production de glycannes sulfatés chez *E.coli*, seule la chitoooligosaccharide sulfotransférase encodée par le gène *nodH* de *R.meliloti* a été démontrée active (Samain, 1999). Des travaux de recherche ont permis d'identifier un gène d'origine procaryote encodant une ST similaire.

1. Essais de sulfatation avec KpsS

Lors d'une étude sur l'effet de la sulfatation des facteurs de nodulation, le gène de *Mesorhizobium loti* responsable de la synthèse d'une sulfotransférase a été identifié et nommé *KpsS* (Townsend, 2008). Sa surexpression chez *E.coli* a permis de démontrer que cette sulfotransférase modifie le KPS de *M.loti* ainsi que le monosaccharide fucose (substituant proposé du KPS de *M.loti*) mais pas du glucose, mannose ou xylose. *KpsS* est indispensable à la biosynthèse de KPS normaux et donc sulfatés.

Nous avons donc cloné le gène *kpsS* dans le plasmide pUC19, à grand nombre de copie et sous le contrôle du promoteur fort Plac. La sulfotransférase KpsS encodée par le gène *kpsS* a été démontrée active sur le monosaccharide fucose (Townsend, 2008). Au laboratoire, la synthèse de Fuc α 1-2Lac à partir du lactose a déjà été réalisée grâce à la souche ZW-pwKS-*futC*-pBBR-*rca* qui surexprime le gène *futC* encodant pour une α 1-2 fucosyltransférase et le gène *rca*, activateur de l'opéron colanique, qui active la voie de biosynthèse de l'acide colanique et permet de disposer d'une réserve suffisante de GDP-fucose, le donneur de fucose (Dumon, 2006).

La KpsS a été testée pour son potentiel à sulfater ce motif Fuc-Lac. La souche LB-15 a été construite en transformant le plasmide pUC-*KpsS* dans la souche ZW-pwKS-*futC*-pBBR-*rca*. Cette souche recombinante était potentiellement capable de produire le sulfo-Fuc-Lac.

Une culture de 200 mL de la souche LB-15 a été réalisée dans les conditions standards à partir de 2.5 g/L de lactose comme accepteur initial et une alimentation en glucose 50% (des problèmes de croissance ayant été observés avec une alimentation en glycérol 50% ; résultats non montrés). La culture a été arrêtée après 16 heures de production et une CCM des fractions intra- et extracellulaires a été réalisée (fig 59).

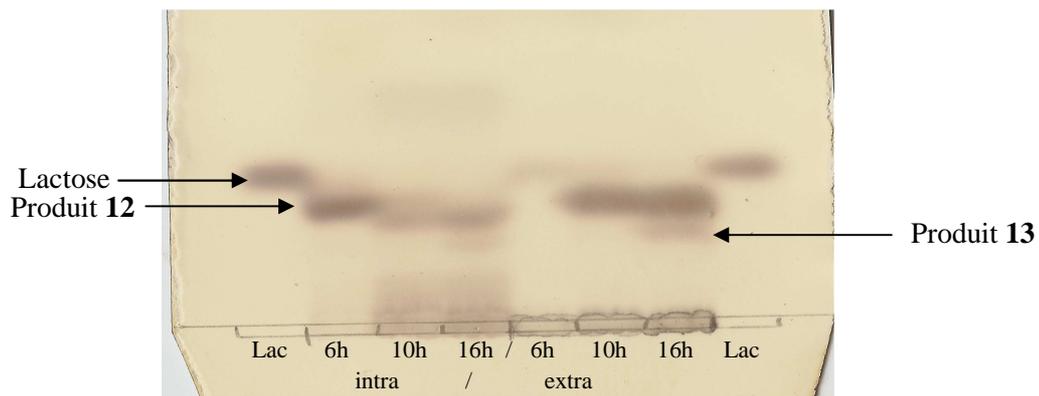


Figure 59 : chromatographie sur couche mince de la fraction intracellulaire (intra) et de la fraction extracellulaire (extra) finales issues de la culture de la souche LB-15, sur-exprimant les gènes *futC*, *rca* et *kpsS*, à partir de lactose au bout de 6 heures, 10 heures et 16 heures de production.

Au cours de la culture, le lactose était accumulé dans le milieu intracellulaire et était progressivement consommé. Un nouveau produit **12** apparaissait en fin de culture dans le milieu

intracellulaire et dans le milieu extracellulaire où il a été exporté. Ce produit **12**, migrant moins que le lactose, a été identifié par analyse par spectrométrie de masse basse résolution (Fig 60).

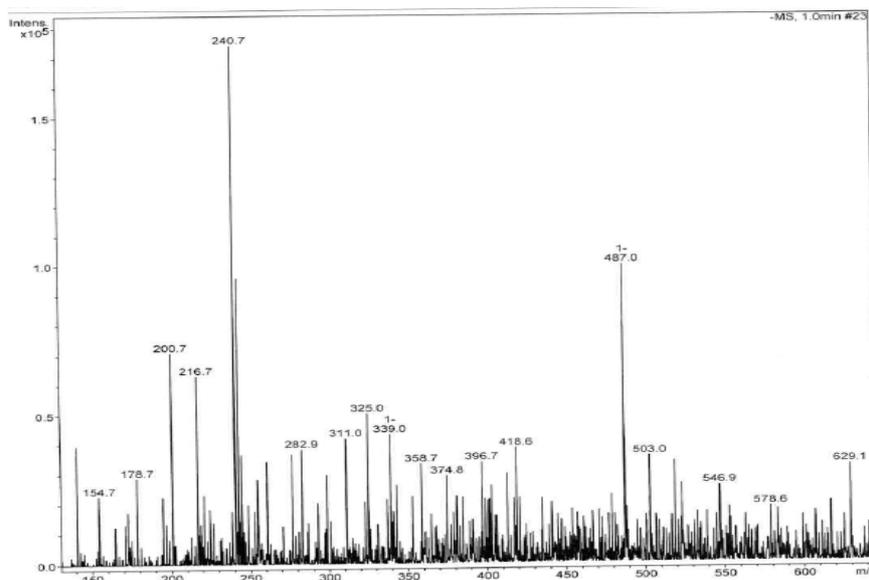


Figure 60 : analyse du spectre de masse du produit **12** par électrospray en mode négatif dans de l'eau.

Le spectre présente un pic moléculaire [M-1] à la masse $m/z=487$, la molécule **12** a donc une masse moléculaire de 488 g/mol, et correspondait donc au Fuc-Lac. La synthèse du Fuc-Lac a bien été réalisée par la souche LB-15, celui-ci était synthétisé dans le milieu intracellulaire avant d'être exporté dans le milieu extracellulaire.

Un second composé **13** était produit au cours de la culture de cette souche dans le milieu intracellulaire puis exporté dans le milieu extracellulaire où il s'accumulait en fin de culture. Après purification sur CCM, ce produit **13** a été analysé par spectrométrie de masse basse résolution (fig 61).

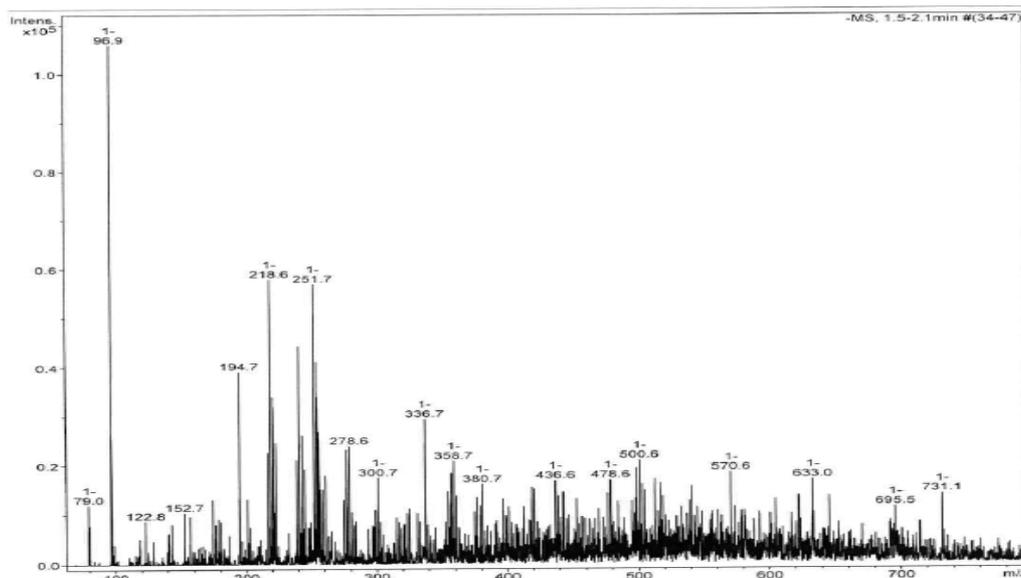


Figure 61 : analyse du spectre de masse du produit **13** par électrospray en mode négatif dans de l'eau.

Aucun pic moléculaire du produit sulfaté sulfo-Fuc-Lac n'avait été détecté. Le spectre présentait un pic moléculaire [M-1] à la masse $m/z=633.0$ dont la molécule avait une masse moléculaire de 634.0 g/mol, et pouvait correspondre au produit di-fucosylé de masse 634.58 g/mol.

L'absence de composé sulfo-Fuc-Lac indiquait que la souche LB-15, sur-exprimant le gène *kpsS*, n'avait donc pas été capable de réaliser la sulfatation du composé Fuc-Lac, pourtant disponible à l'intérieur des bactéries. La sulfotransférase KpsS, pourtant démontrée active sur le monosaccharide fucose, n'était peut-être pas active sur le motif Fuc-Lac. Le trisaccharide Fuc-Lac était être trop volumineux pour intégrer le site de liaison de l'enzyme.

Une autre possibilité était que le donneur de sulfate, le PAPS, n'était pas suffisamment disponible dans les bactéries. Des éléments de réponse peuvent être trouvés dans le fait que, tout comme les autres STs procaryotes des polysaccharides, la KpsS ne possède pas la séquence consensus des mammifères GXXGXXK, qui représente le site de liaison au PAPS. Cependant une étude a permis d'identifier une ORF dans le génome de la souche *Mesorhizobium loti* qui montrait une similarité avec la lipopolysaccharide sulfotransférase LpsS de *Sinorhizobium meliloti* (Cronan, 2009). Des études comparatives de ces deux gènes ont permis de déduire qu'une expression endogène de PAPS, grâce à *nodP* et *nodQ*, était favorable et indispensable à une bonne activité des STs. Le développement d'une souche d'*E.coli* capable de fournir une réserve de PAPS endogène contrôlée est ici aussi une étape indispensable dans la voie de biosynthèse de motifs sulfatés grâce à la sulfotransférase encodée par le gène *kpsS*.

II. Sulfatation chimique

Le travail de ce chapitre rapporte la synthèse et la validation biologique d'un analogue de l'épitope trisaccharide HNK-1. Le 3-*O*-sulfo- β -D-GlcA-(1 \rightarrow 3)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)- β -D-Glc-allyle a été préparé par glucuronylation enzymatique du lactoside d'allyle par ingénierie chez une souche recombinante d'*Escherichia coli* suivie par une sulfatation chimio-sélective. Ultérieurement la liaison covalente entre le trisaccharide oxydé par l'ozone et l'albumine de sérum bovin a produit un néo-glycoconjugué qui a été testé par des anticorps spécifiques de l'épitope glucidique HNK-1. Les résultats obtenus au cours cette étude ont été publiés (Bastide, 2010).

L'épitope HNK-1 (3-*O*-sulfo- β -D-GlcA-(1 \rightarrow 3)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcNAc) est une composante importante des glucides des glycoprotéines et des glycolipides des animaux impliqués dans les interactions cellule-cellule et cellule-substrat, la migration cellulaire, et la régénération des neurones (Jungalwala, 1994). En outre, son expression est corrélée positivement à certains types de cancer comme le cancer du rein et des mélanomes (Casado, 2008 ; Allory, 2005). Enfin, les neuropathies auto-immunes peuvent être associées à la présence d'anticorps HNK-1 (Baumann, 2001). Ainsi la synthèse de néo-glycoconjugués et de mimétiques peuvent trouver des applications potentielles dans l'ingénierie tissulaire pour la régénération des nerfs (Nomura, 2006), le diagnostic ou le traitement de cancer.

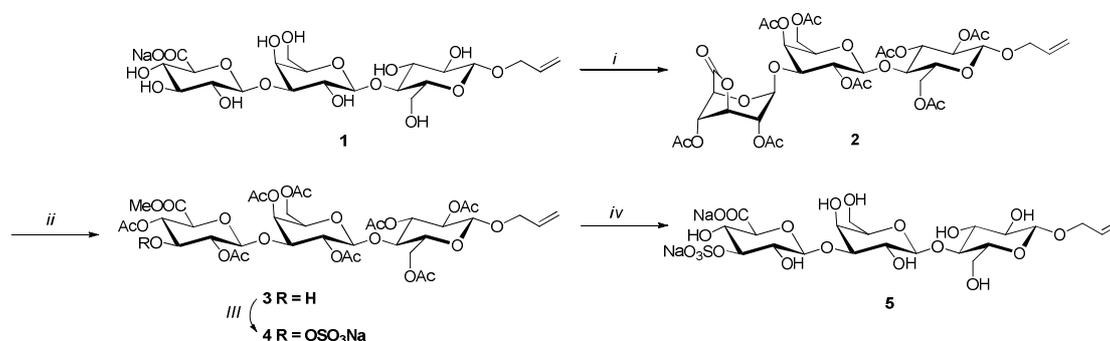
Comme avec les autres structures de glucides complexes exprimés en quantité infime dans les cellules humaines, le glycanne HNK-1 n'est pas disponible pour la conception de biomatériaux avec des applications médicales.

Le frein rencontré dans les synthèses chimiques signalées à ce jour pour la préparation de glycolipides HNK-1 est le nombre important d'étapes inhérentes à la glycosylation chimique. Les deux groupes de Ogawa et Hasegawa a rapporté des approches synthétiques de dérivés 3-*O*-sulfo glucuronyl paraglobosides employant un groupe de protection temporaire levulynoylé afin de différencier le groupe OH en C3 du résidu glucuronyl (Nakano, 1993 ; Isogai, 1996) Plus tard, Kornilov et al. ont considérablement amélioré l'accès aux oligosaccharides 3-*O*-sulfo-glucuronyl en introduisant une séquence de lactonisation-méthanolyse permettant une isolation simple de la position C3 de ce résidu (Kornilov, 2000). Cette procédure est efficace sur les oligosaccharides non protégés, nous avons pensé que cela pourrait être appliqué à des oligosaccharides produits enzymatiquement.

Dans ce travail, une nouvelle synthèse pratique de l'oligosaccharide 3-*O*-sulfo-glucuronyl basée sur la combinaison d'outils enzymatiques et chimiques a été décrite. L'étape de glucuronylation a été accomplie en réalisant la culture de la souche bactérienne LB-10 exprimant la β -glucuronyltransférase GlcAT-P et l'UDP GlcA-synthase d'*E.coli* K5 à partir de lactoside d'allyle. Au final, le β -lactoside d'allyle a été converti en sa forme glucuronylé.

1. Synthèse chimique du 3-sulfo-GlcA-Lac-Allyl

La sulfatation régiosélective de l'oligosaccharide recombinant GlcA-Lac-Allyl (**1**) a été réalisée selon le protocole décrit par Kornilov *et al.* (Kornilov, 2000) via la séquence réactionnelle résumée sur la figure 62.



i) Ac₂O, 80°C, 4 h, then RT, pyridine, DMAP (54%); ii) MeOH, AcONa (82%); iii) SO₃/pyridine, DMF (64%); iv) LiOH, THF/H₂O then MeOH/MeONa (60%).

Figure 62 : Schéma de synthèse chimique du 3-sulfo-glucuronyle-(1→3)-β-lactoside

Une lactonisation entre les positions C-3 et C-6 du motif glucuronyle du composé GlcA-Lac-Allyle **1** a été réalisée par traitement à l'anhydride acétique à 80 ° C. Une protection totale des autres hydroxyles du trisaccharide a été effectuée par peracétylation par addition de pyridine et une quantité catalytique de DMAP et une purification. Le produit **2** a été synthétisé avec un rendement de 54%.

Une déprotection sélective de la position C-3 du résidu glucuronyle a été réalisée grâce à la méthanolyse du produit **2**, par ajout d'acétate de sodium anhydre. La position C-6 a été protégée par un groupement méthyl, la position C-3 présentait le seul hydroxyle libre. Le produit **3** a ainsi été obtenu d'une manière efficace (82% après purification) mais une désacétylation partielle du trisaccharide a été observée pour un temps de réaction prolongé au cours de cette étape. Une surveillance attentive de l'évolution de la réaction était nécessaire de ne pas entraver la fin de la synthèse.

La sulfatation du groupe OH libre en position C-3 de l'unité GlcA du produit **3** a été réalisée avec la SO₃.Py dans le DMF. Après purification, le produit **4** a été obtenu avec un rendement de 64%.

Finalement la déprotection des groupes protecteurs esters du produit **4** sulfaté a été réalisée. Le produit **5** a été obtenu avec un rendement de 60%. Le spectre RMN ¹³C du produit **5** a été en accord avec les données rapportées dans la littérature et affichait un pic caractéristique d'un carbone C-3 sulfaté à 84,2 ppm, confirmant ainsi la structure du produit attendu (fig 63).

fonction amino de la protéine. La néoglycoprotéine **6** a été obtenue. Le couplage de l'oligosaccharide sulfaté à la BSA était d'environ 30 résidus par protéine.

La néoglycoprotéine **7**, porteuse de la forme oligosaccharidique non sulfatée, a été obtenue selon le même protocole à partir du couplage entre le glycanne non sulfaté GlcA-Lac-Allyl et la BSA. Le couplage de l'oligosaccharide non sulfaté à la BSA était d'environ 19 résidus par protéine. Cette néoglycoprotéine, porteuse de l'analogue non sulfaté de l'épitope HNK-1 devait servir de standard pour les futurs tests.

3. Tests ELISA avec des anticorps HNK-1

Un test Elisa a été réalisé à partir de microplaques revêtues des néoglycoprotéines sulfatée **6** et non sulfatée **7**. Ces glycoconjugués ont été testés par trois anticorps HNK-1. Ces trois anticorps monoclonaux de souris présentaient tous la même spécificité de substrat et reconnaissaient seulement les formes naturelles sulfatés des conjugués HNK-1, mais différaient de par leur origine de production. Le résultat de la reconnaissance de nos glycoconjugués par ces anticorps est représenté sur la figure 65.

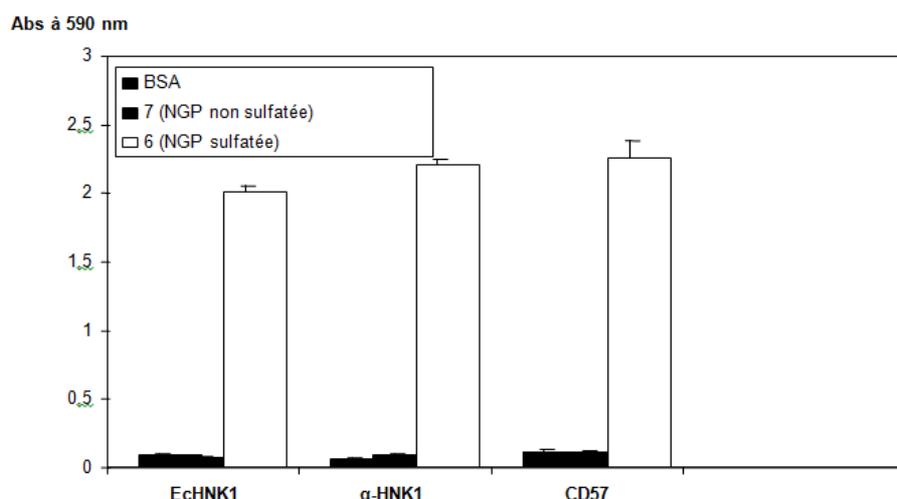


Figure 65 : Liaison des trois anticorps HNK-1 aux glycoconjugués synthétiques sulfaté (**6**) et non sulfaté (**7**). Les moyennes et les écarts-types des mesures en triple sont indiqués.

Tous les anticorps HNK-1 ont fortement réagi avec la néoglycoprotéine **6** (forme sulfatée) alors qu'aucune reconnaissance de la néoglycoprotéine **7** n'a été observée (forme non sulfatée). Cela confirmait le fait que la présence de sulfate était une condition indispensable à la détection du motif oligosaccharidique par un anticorps HNK-1.

De plus, la reconnaissance de la néoglycoprotéine **6** indiquait que les anticorps HNK-1 étaient capables de reconnaître notre analogue oligosaccharidique sulfaté de l'épitope HNK-1 en dépit de l'absence du groupe acétamido en raison du remplacement du GlcNAc par le Glc dans ce composé

synthétique. Ces données corroboraient une étude précédente faite avec des analogues synthétiques sulfolucuronyl glycosphingolipides qui avait montré qu'un minimum de deux sucres 3-*O*-sulfo- β -D-GlcA-(1 \rightarrow 3)- β -D-Gal- sur un céramide avait été suffisant pour une reconnaissance des anticorps HNK-1 (Tokuda, 1998). Une autre étude a montré que le motif HNK-1/glycosaminoglycane 3-sulfo-GlcA- β 1,4-Xyl-pourrait aussi réagir avec les anticorps HNK-1 (Shibata, 1995). Ces tests confirment le rôle majeur du groupement sulfate dans le processus de reconnaissance oligosaccharide/anticorps et valident le potentiel de l'analogue synthétisé pour la détection d'anticorps spécifiques anti-HNK1.

III. Essais de sulfatation chez *Saccharomyces cerevisiae*

1. Biosynthèse et disponibilité des précurseurs de sulfatation

Une autre alternative de biosynthèse *in vivo* de glycanes sulfatés est approchée dans ce chapitre. Depuis sa mise au point au laboratoire, le procédé de biosynthèse totale *in vivo* d'oligosaccharides recombinants utilise la bactérie *E.coli*. De nombreuses structures oligosaccharidiques ont ainsi pu être synthétisées grâce à l'utilisation de glycosyltransférases recombinantes. Le procédé est bien maîtrisé, très avantageux et efficace, ainsi la banque de glycanes produits est très variée et vaste. Cependant certaines structures oligosaccharidiques présentant un intérêt biologique ne sont pas actuellement accessibles par ce procédé. Si certaines structures sont absentes par manque de temps pour effectuer les études et leurs synthèses, d'autres sont absentes car les essais de biosynthèse ont échoué comme c'est le cas pour les essais de sulfatation décrits dans le chapitre I.

Il existe une différence notable au niveau de la traduction des gènes entre les eucaryotes et les procaryotes. La simple expression du domaine catalytique d'un gène eucaryote sur un plasmide transformé chez *E.coli* suffit la plupart du temps à encoder pour une enzyme active et soluble dans le cytoplasme de la bactérie. Plusieurs gènes eucaryotes ont ainsi été clonés et décrits comme actifs dans le cadre de l'« usine cellulaire » chez *E.coli*. Cependant, au cours de nos travaux, cette stratégie s'était montrée inefficace vis-à-vis des STs que nous testions. Malgré tous les essais de sulfatation avec différentes STs d'origine eucaryote (la HNK-1ST d'origine humaine ou de *R.norvegicus*, la GlcNAc6ST-2 d'origine humaine, ainsi que la Gal3ST), aucun résultat de sulfatation n'avait été observé.

La production de protéine *via* la voie de synthèse des cellules eucaryotes passe par une haute fiabilité des processus de repliement, d'assemblage et de modification requis pour une activité biologique. Chez un organisme procaryote, les protéines hétérologues peuvent tendre à ne pas se replier correctement car le niveau nécessaire de repliement pour rendre la protéine soluble ou le niveau de modification sont trop faibles ou la protéine peut juste être incapable de se replier correctement car les facteurs requis pour les modifications post-traductionnelles originales sont absents ou ont un impact faible. Nous avons voulu contourner ce problème en adaptant la technologie d'ingénierie métabolique à l'expression d'enzymes actives chez un organisme eucaryote.

La levure de boulanger *Saccharomyces cerevisiae* est devenue le modèle eucaryote le plus sophistiqué pour la technologie de l'ADN recombinant (Ostergaard, 2000). L'une des raisons principales est que la génétique de la transmission de la levure est extrêmement bien comprise et la réserve de milliers de mutants présentant des centaines de phénotypes différents est une ressource inestimable lorsque l'on se sert de la levure comme d'un système moléculaire. Nous avons choisi

d'utiliser des souches de *S.cerevisiae* W303 MAT α ade2-1 his3-1,15 leu 2-3,112 trp1-1, ura3-1, auxotrophes pour cinq acides aminés qui permettent de réaliser les sélections des clones positifs lors de croissance sur des substrats adaptés.

Un autre avantage important de la levure est la présence chez celle-ci du plasmide « 2 microns » circulaire naturel de 6.3 kb. Il est à la base de plusieurs vecteurs de clonage sophistiqués, dont les vecteurs pESC (Invitrogen) que nous avons choisi. Ces plasmides facilitent les transformations et confèrent à la construction une capacité de répllication autonome dans la cellule de levure. Des gènes ou des parties géniques peuvent ainsi être introduits dans la levure et leur expression en glycosyltransférases ou en sulfotransférases permettent la synthèse de glycanes recombinants dans la levure.

Les vecteurs pESC contiennent les promoteurs de levure GAL1 et GAL 10 en sens opposé. Avec ces vecteurs, un ou deux gènes eucaryotes (ou procaryotes) peuvent être introduits dans la souche de levure hôte sous le contrôle de promoteur répressible (Schultz, 1987). En absence de galactose et/ou en présence de glucose, les gènes sous le contrôle de ces promoteurs sont réprimés. En absence de glucose et en présence de galactose, l'expression des gènes est induite. La séquence des vecteurs contient un site multiple de clonage et chacun des vecteurs contient un des quatre marqueurs différents de sélection de la levure (HIS3, TRP1, LEU2 ou URA3) (fig 66).

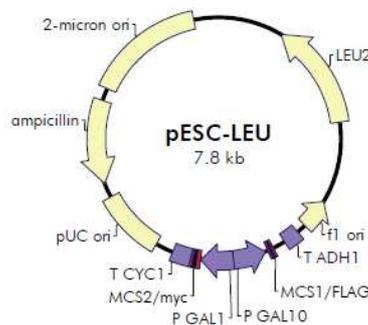


Figure 66 : le vecteur pESC-LEU (Invitrogen)

1. Mise au point des conditions standards de fermentation

L'adaptation de la synthèse de glycanne par ingénierie métabolique chez la levure était innovante et nouvelle. Nous avons également fait le choix de supprimer la méthionine du milieu minimum standard SD utilisé (Met⁻) de manière à augmenter la réserve de PAPS endogène produit chez la levure *via* les voies de biosynthèse de la méthionine. Ainsi de nombreuses optimisations, indispensables à la culture des levures en fed-batch, des conditions et des milieux de cultures ont dû être réalisées (résultats non montrés).

Une culture de 200 mL de la souche sauvage W303 (LBSC01) a été réalisée dans les conditions standards à partir de galactose (20 g/L) et de lactose (1.25 g/L). Après 40 heures de production, la culture a été arrêtée et une CCM a été réalisée (fig 67).

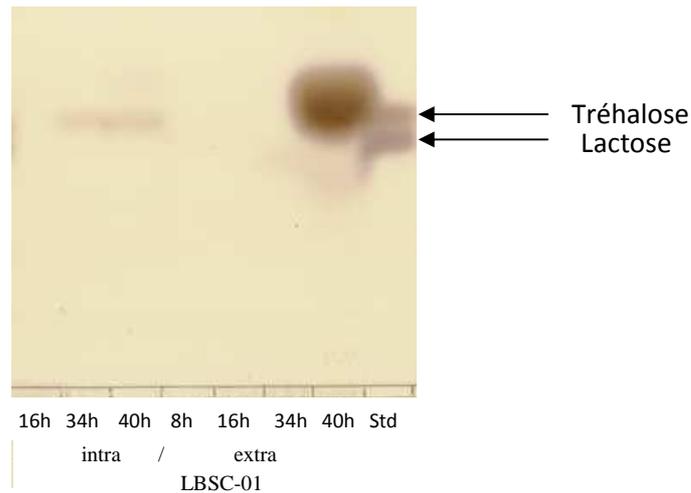


Figure 67 : Chromatographie sur couche mince des fractions intra et extracellulaires de la culture de la souche W303 après 8 heures, 16 heures, 34 heures et 40 heures de culture ; dépôt de standard tréhalose (Tré) et lactose (Lac).

Aucun problème de croissance n'a été détecté tout au long de la culture, tout le glucose initial a été consommé, et une légère internalisation du galactose a été constatée. La forte concentration en galactose dans le milieu extracellulaire était due à un ajout involontaire de galactose dans le milieu de culture en fin de culture. La souche W303 de *S.cerevisiae* était donc capable d'utiliser le galactose comme source de carbone et d'énergie pour sa croissance, et était également capable de produire sa propre méthionine sans effet sur la croissance dans des conditions de milieu déficient en méthionine. Toutefois la production d'un nouveau produit a été observée dans les fractions intracellulaire et extracellulaire en fin de culture. D'après l'analyse par CCM (fig 67) ce produit se comporte comme un disaccharide neutre.

Des recherches bibliographiques sur les conditions de cultures de *S.cerevisiae* ont permis d'identifier ce disaccharide comme le tréhalose (1- α -D-glucopyranosyl- α -D-glucopyranoside). Il a été décrit comme ayant des fonctions de protection qui contribuent à la survie de la cellule de levure durant des conditions de stress environnementaux comme la chaleur, la congélation, la déshydratation ou l'exposition à des substances chimiques (Lillie, 1980). Les résultats ont montré que la concentration intracellulaire en tréhalose était directement liée à la survie quand les cellules de levures subissaient un stress osmotique durant la phase de croissance (Hounsa, 1998). L'ajout de galactose (20 g/L) comme inducteur et source de carbone au début de la phase de production changeait la concentration osmotique du milieu extracellulaire, ce qui expliquait la production de tréhalose par la souche pour réduire cet écart d'osmolarité. Un dépôt de tréhalose comme standard était ajouté lors des analyses par CCM des futures cultures.

La souche W303 avait accumulée du lactose dans la fraction extracellulaire ce qui indiquait que la souche ne dégradait pas le lactose mais surtout que le lactose n'avait pas été internalisé.

2. Internalisation du lactose

Avant de tester toute activité d'une sulfotransférase/glycosyltransférase pour synthétiser des motifs oligosaccharidiques par le procédé d'« usine cellulaire » chez *S.cerevisiae*, il était important de s'assurer que les accepteurs de sulfatation/glycosylation étaient disponibles à l'intérieur des levures. L'accepteur de glycosylation le plus souvent utilisé au laboratoire est le lactose. Plusieurs études ont été réalisées sur l'utilisation du lactose comme source d'énergie et de carbone chez des levures. *S.cerevisiae* n'a pas de système de perméase au lactose, ainsi le lactose ne peut pas être transporté au travers de la membrane cellulaire. Cependant *S.cerevisiae* n'encode pas non plus la β -galactosidase qui coupe la liaison β -4 du lactose pour former des résidus glucose et galactose. De nombreux organismes procaryotes et eucaryotes sont capables d'internaliser sélectivement les sucres de leur environnement à l'aide de protéines de transport membranaires ou perméases. *Kluyveromyces lactis* est l'une des rares levures qui peuvent transporter le lactose au travers de la membrane cellulaire et l'utiliser comme source de carbone et d'énergie grâce à l'expression des gènes *lac4* (β -galactosidase) et *lac12* (lactose perméase) (Naumov, 2008). Des études ont montrées que ces deux gènes, clonés simultanément, sont responsables de l'internalisation du lactose et de sa dégradation en glucose et galactose à l'intérieur de la levure (Jurascik, 2006 ;Rubio-Teixeira, 2001).

La protéine Lac12 de *Kluyveromyces lactis* ne présente aucune similitude apparente avec la lactose perméase LacY de la bactérie *E. coli* utilisée dans nos souches de bactéries recombinantes pour internaliser le lactose (Chang, 1988). Néanmoins la lactose perméase de *K.lactis*, d'origine procaryote, semble plus adaptée à un clonage et une expression dans *S.cerevisiae* que la lactose perméase d'*E.coli*.

Nous avons cloné le gène entier *lac12* à partir d'ADN de *K.lactis* dans un vecteur d'expression pESC. Le plasmide recombinant a été transformé dans la souche LBSC-01 (W303 sauvage) de *S.cerevisiae*. La souche LBSC-04 obtenue a été testée pour sa capacité à internaliser et accumuler le lactose dans les cellules et le rendre disponible pour les glycosyltransférases

Une culture de 200 mL de LBSC-04 a été réalisée dans les conditions standards à partir de galactose (20 g/L) et de lactose (1.25 g/L). Après 40 heures de production, la culture a été arrêtée et une CCM a été réalisée (fig 68).

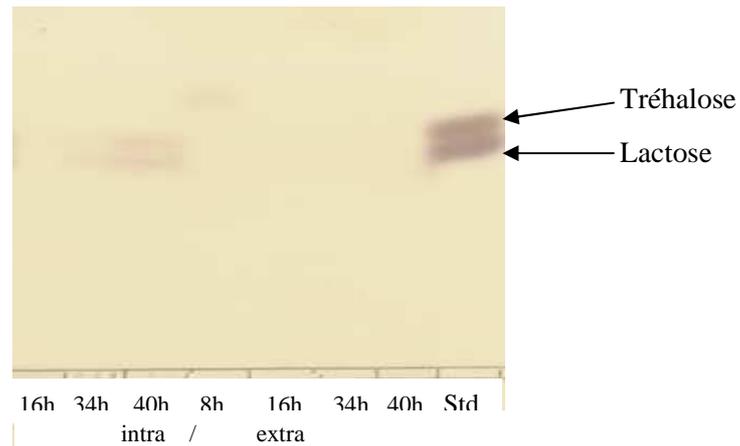


Figure 68 : Chromatographie sur couche mince des fractions intra et extracellulaires de la culture de la souche LBSC-04, surexprimant la lactose perméase de *K.lactis* ; dépôt de standard tréhalose (Tré) et lactose (Lac).

Deux composés ont été observés dans la fraction intracellulaire : un premier composé minoritaire qui correspondait au tréhalose et un second composé qui correspondait au lactose. Cela caractérisait une accumulation du lactose dans la fraction intracellulaire à l'issue de la culture de la souche LBSC-04 ce qui indiquait que la lactose perméase Lac12 était bien exprimée et active.

Cependant au cours de cultures parallèles de la souche LBSC-04 des problèmes d'internalisation du lactose (500 mg/L) ont été constatés en cas de concentration extracellulaire en galactose (20 g/L) trop importante. Le galactose est également un accepteur de la lactose perméase (Sahin-Toth, 2000) où il se fixe dans le site de liaison au β -galactoside et entre en compétition avec le lactose ; en effet la lactose perméase est un transport de β -galactosides dont fait partie le galactose utilisé. Le lactose étant minoritaire, son internalisation était rendue plus difficile. Une augmentation de la quantité de lactose initial (5 g/L) ajouté dans le milieu de culture, ainsi que l'ajout de galactose régulier tout au long de la culture (0.750 g/L/h) avait permis de résoudre ces problèmes (résultats non montrés).

La construction d'une souche recombinante de *S.cerevisiae* exprimant la lactose perméase de *K.lactis* avait été réalisée. La démonstration que cette souche était capable d'internaliser et d'accumuler le lactose dans les cellules de levure a été faite, rendant disponible notre accepteur initial vis-à-vis des glycosyltransférases et/ou sulfotransférases. C'était la première souche recombinante décrite de *S.cerevisiae* à réaliser *in vivo* une internalisation et une accumulation du lactose. A partir de là, des essais de biosynthèse de glycanes grâce à ces glycosyltransférases à partir du lactose chez *S.cerevisiae* pouvaient débuter.

3. Biosynthèse du GlcA-Lac

La biosynthèse du précurseur trisaccharidique GlcA β 1-4Gal β 1-4Glc à partir du lactose chez *E.coli* a été décrite et améliorée dans le chapitre I. Cette étape de la stratégie de biosynthèse du motif antigénique HNK-1 était bien maîtrisée, malheureusement la sulfatation du trisaccharide ne l'était pas du tout. Cet échec de sulfatation par la HNK-1ST, même sur l'accepteur GlcA-Lac, nous avait obligé à concevoir une autre stratégie de biosynthèse du HNK-1 chez la levure. Aucun travail de synthèse *in vivo* du GlcA-Lac, ni même d'expression des glucuronyltransférases à notre disposition chez *S.cerevisiae* n'avait été décrit.

La levure *Saccharomyces cerevisiae* n'avait pas la capacité endogène de synthétiser ou de consommer de l'UDP-acide glucuronique (Oka, 2006). Toutefois, la levure avait une grande réserve cytoplasmique d'UDP-glucose qui pouvait être utilisé pour synthétiser de l'UDP-acide glucuronique à partir d'une UDP-glucose déshydrogénase. Tout cela a été grandement étudiée chez *E.coli* (Yavuz, 2008) où ont été surexprimés sur le même plasmide le gène *glcAT-P* et le gène *kfiD* codant pour l'UDP-glucose déshydrogénase d'*E.coli* K5 pour produire le GlcA-Lac à partir de lactose.

Nous avons donc cloné le même duo de gène *glcAT-P-kfiD* dans le plasmide vecteur pESC-URA, sous le contrôle respectif des promoteurs GAL1 et GAL10. Le plasmide recombinant pESC-Ura-*glcAT-kfiD* a été transformé dans la souche LBSC-04 pour former la souche LBSC10.

La culture de 200 mL de la souche LBSC-10 a été réalisée dans les conditions standards de fermentation avec 5 g/L de lactose comme accepteur initial et du lactose a été ajouté dans l'alimentation. Aucun problème n'a été détecté durant la production. Une analyse de suivi de fermentation a été réalisée par CCM (fig 69).

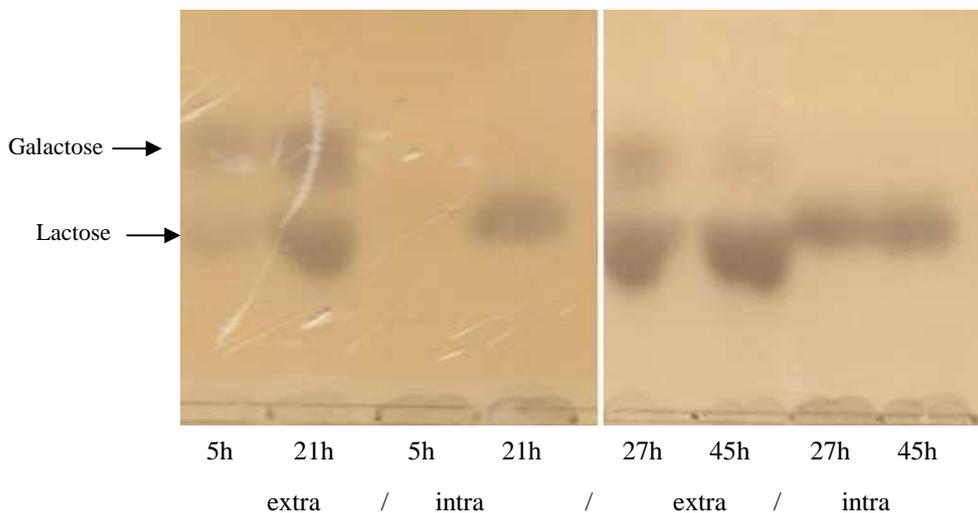


Figure 69 : Chromatographies sur couche mince des fractions intracellulaires et extracellulaires de la culture LBSC-10, surexprimant les gènes *glcAT-P* et *kfiD*, à partir de lactose à différents temps de production chez *S.cerevisiae* : 5 heures, 21 heures, 27 heures et 45 heures.

Le lactose a été internalisé et accumulé dans le milieu intracellulaire. Aucun autre produit n'a été détecté, ni l'UDP-GlcA, ni le GlcA-Lac dans les deux milieux. Malgré l'absence de production de GlcA-Lac, l'activité de la GlcAT-P n'avait pas pu être définie comme inactive ou non. En effet la production d'UDP-GlcA était une condition indispensable à une production efficace de GlcA-Lac. Sans ajout de donneur exogène et sans production de donneur endogène par KfiD, la GlcAT-P, même si elle était produite sous forme active, était incapable de catalyser la synthèse de GlcA-Lac. Le problème d'expression de *kfiD* chez *S.cerevisiae* devait être réglé avant de continuer les études de biosynthèse du GlcA-Lac.

4. Biosynthèse du GlcNAc-Lac

Des essais de biosynthèse *in vivo* chez la levure d'un second motif oligosaccharidique, précurseur de sulfatation, étudié et utilisé dans le chapitre I, ont été réalisés. La biosynthèse *in vivo* chez *S.cerevisiae* de ce motif, le GlcNAc-Lac, n'a jamais été étudiée alors que nous la maîtrisons chez *E.coli* (Priem, 2002). Le gène responsable de la synthèse du motif trisaccharidique GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc, le gène *lgtA* (β 1-3 N-acétylglucosaminyltransférase) de *Neisseria meningitidis*, a donc été cloné sur le plasmide d'expression pESC-HIS. Le plasmide recombinant a été transformé dans la souche LBSC-04 pour former la souche LBSC-11.

Une culture de 200 mL de LBSC-11 a été réalisée dans les conditions standards avec 5 g/L de lactose. La phase de production de la culture LBSC-11 a duré 40 heures. Au terme de cette culture, une analyse par CCM a été réalisée (fig 70).

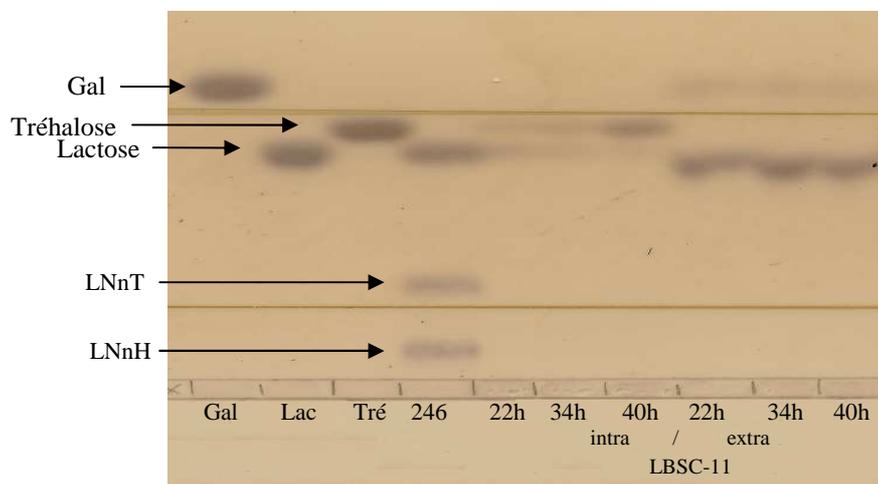


Figure 70 : chromatographie en couche mince des fractions extracellulaires (extra) et intracellulaires (intra) issues de la culture de la souche LBSC-11, surexprimant le gène *lgtA*, après 22 heures, 34 heures et 40 heures de production à partir de lactose. Des standards ont été déposés : galactose (Gal), lactose (Lac), tréhalose (Tré) et un mélange de lactose/LNnT/LNnH (2,4,6).

Du tréhalose a été produit dans les deux milieux, et une internalisation et une accumulation du lactose et du galactose en fin de culture dans la fraction intracellulaire ont été détectées.

Aucun produit modifié GlcNAc-Lac n'a été identifié sur la CCM, où a été déposé un standards de cet oligosaccharide. Le fait qu'aucune modification de l'accepteur lactose n'ait eu lieu indiquait une inactivité de l'enzyme LgtA. Une des explications possibles sur le fait que l'enzyme LgtA ne soit pas active ou pas disponible chez *S.cerevisiae* pouvait venir du fait que le gène *lgtA* qui encodait cette enzyme était d'origine procaryote (de *Neisseria meningitidis*) et qu'il était exprimé dans une souche eucaryote. Des problèmes de repliement et surtout de localisation peuvent être à l'origine de l'inactivité de LgtA.

2. Essais de sulfatation

1. Gal-3ST

Aucun accepteur de sulfatation n'ayant été synthétisé chez la levure, aucun essai de sulfatation n'avait encore été effectué. Le seul accepteur potentiel de sulfatation disponible chez *S.cerevisiae* était le lactose, présentant un motif galactoside terminal.

Le gène de la sulfotransférase Gal-3ST-2 (désigné GP3ST) a été identifié sur le chromosome humain 2q37.3 (Honke, 2001). La protéine recombinante encodée par ce gène, synthétisée dans les cellules COS-1, a des activités de sulfatation *in vitro* envers des oligosaccharides contenant β -galactosides non réducteurs comme la N-acétyllactosamine, le lactose, le lacto-N-tétraose (LC4), lacto-N-néotétraose (nLc4). Les études cinétiques ont suggéré que la GP3ST était capable d'agir sur les chaînes de type 1 (Gal β 1-3GlcNAc-R) et de type 2 (Gal β 1-4GlcNAc-R) avec des efficacités similaires, permettant une éventuelle biosynthèse du sulfo-sLeX.

Le gène *gal3ST-2* humain encode une protéine de 398 acides aminés, parmi lesquels une partie transmembranaire a été identifiée. Ainsi nous avons cloné seulement la séquence codante du domaine catalytique (370 acides aminés) du gène dans un plasmide pESC sous le contrôle du promoteur GAL10. Le plasmide recombinant a été transformé dans la souche LBSC-04, la souche LBSC-14 a été obtenue.

Une culture de la souche LBSC-14 a été réalisée dans les conditions standards avec 10 g/L de lactose comme accepteur initial. La culture a été arrêtée après 44 heures de production sans problème de croissance. Une analyse par CCM a été réalisée (fig 71).

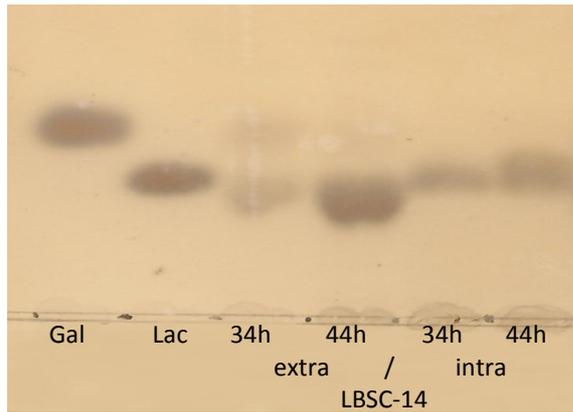


Figure 71 : chromatographie en couche mince des fractions extracellulaires (extra) et intra cellulaires (intra) issues de la culture de la souche LBSC-14, surexprimant le gène *gal3ST-2* après 34 heures et 44 heures de production. Des standards ont été déposés : galactose (gal), lactose (lac).

Le lactose a été internalisé et accumulé dans le milieu intracellulaire au fur et à mesure de la culture. Malheureusement aucun autre produit n'a été détecté, indiquant une absence de sulfatation du motif lactose. La Gal-3ST-2 n'a pas été capable de réaliser la sulfatation du motif lactose, ni du motif galactose, pourtant disponible dans la levure.

CONCLUSION

La sulfatation des glycanes est un élément important de leurs propriétés biologiques. Celle-ci dépend de l'activité de sulfotransférases, dont l'activité chez *Escherichia coli* a été très peu étudiée. Par contre, certaines de ces enzymes utilisent des accepteurs oligosaccharidiques dont la synthèse est maîtrisée par le procédé d'usine cellulaire.

L'ambition du projet était de parvenir à exprimer des gènes de sulfotransférases eucaryotes et procaryotes afin de permettre *in vivo* la sulfatation d'accepteurs oligosaccharidiques endogènes produits dans la bactérie. Les oligosaccharides sulfatés devaient être produits en grande quantité afin de permettre leur caractérisation et leur disponibilité pour des études ultérieures de couplage et d'essais biologiques.

L'étude de l'expression des sulfotransférases chez *Escherichia coli* est en soit une première de part l'approche développée. Elle se distingue des approches « classiques » dans le sens où l'activité est étudiée *in vivo*, contrairement à ce qui se fait habituellement où les activités enzymatiques sont dosées après purification.

1. Essais de sulfatation chez *E.coli*

Des gènes de sulfotransférases ont été clonés et évalués pour leur capacité à sulfater leurs accepteurs naturels *in vivo* chez *Escherichia coli*.

1. HNK-1ST

a) HNK-1ST de rat

Les gènes codant pour les sulfotransférases de rat et d'humain ont été identifiés (Ong, 1998, Bakker, 1997). Par contre, peu d'études biochimiques ont été réalisées ; on sait cependant que les domaines catalytiques exprimés dans des lignées cellulaires CHO sont capables de sulfater des accepteurs oligosaccharidiques synthétiques et permettent la synthèse de l'épitope HNK-1 *in vivo* et *in vitro*.

Dans le cadre de notre travail, des études d'activité de sulfatation de la HNK-1ST ont été réalisées sur des motifs oligosaccharidiques produits au niveau endogène. Pour cela la biosynthèse de l'accepteur de sulfatation GlcA-Lac a été améliorée et la biosynthèse d'un accepteur fonctionnalisé GlcA-Lac-Allyle a été réalisée. Sa biosynthèse enzymatique chez *E.coli* et sa caractérisation ont été publiées (Bastide, 2010).

Des essais de sulfatation *in vivo* de ces motifs glucuronylés chez des souches surexprimant le domaine catalytique de la HNK-1ST de rat ont permis la synthèse d'un produit **4** intéressant. Purifié sur résine échangeuse d'anions et analysé par spectrométrie de masse basse résolution, ce produit **4** pourrait correspondre au composé sulfo-GlcA-Lac, indiquant que la HNK-1ST de rat serait capable de

sulfater l'accepteur GlcA-Lac. La prédiction de la séquence codante de la HNK-1ST de rat a révélé la présence de 45 codons rares pour une expression chez *E.coli* ce qui pourrait expliquer des difficultés d'expression de la ST et sa faible activité de sulfatation. Malgré tout, des analyses plus avancées sont nécessaires afin de caractériser ce produit **4** et d'affirmer ou d'infirmer la sulfatation *in vivo* chez *E.coli* d'un oligosaccharide par la HNK-1ST de rat.

Une interaction protéine-protéine, au travers du domaine catalytique de la GlcAT-P de rat et du domaine catalytique de la HNK-1ST de rat, permet une augmentation de l'activité enzymatique de la HNK-1ST *in vitro* conduisant à une biosynthèse séquentielle et efficace du glycanne HNK-1 (Kizuka, 2006). Lors de la tentative d'amélioration de l'activité de la HNK-1ST par construction de souches recombinantes d'*E.coli* produisant des protéines de fusion entre la GlcAT et la HNK-1ST, aucune de ces souches n'a été viable dans les conditions de culture standards. Une étude complémentaire devra être réalisée afin de déterminer la cause de cette mortalité et de vérifier d'éventuelles différences d'activité enzymatique apportées par cette stratégie.

b) HNK-1ST humaine

La HNK-1ST humaine a été également choisie et testée car il existe un anticorps disponible commercial pour cette enzyme. L'anticorps monoclonal de souris antiCHST10 (SIGMA) reconnaît une partie N-terminale de cette ST humaine. Ainsi afin d'améliorer l'activité de la HNK-1ST, nous avons fait synthétiser la séquence codante du domaine catalytique débarrassée des codons rares de la séquence sauvage, et contenant la partie N-terminale reconnue par l'anticorps. Hélas, aucune activité de sulfatation par cette HNK-1ST synthétique n'a été détectée dans les mêmes conditions que lors des essais pour la HNK-1ST de rat.

Un des éléments clé de cette étude est l'expression fonctionnelle de sulfotransférases dans le cytoplasme d'*E.coli*. Néanmoins, l'origine de ces enzymes est souvent eucaryote, ce qui implique des difficultés d'expression liées à de nombreux facteurs, telles que des modifications post-traductionnelles qui peuvent empêcher un repliement tridimensionnel correct et entraîner une production sous forme de corps d'inclusion inactifs.

Une étude de l'expression de l'enzyme HNK-1ST synthétique chez la bactérie a été réalisée par immunorévélation. Cette analyse réalisée avec l'anticorps primaire anti-CHST10, a révélé la présence d'une bande spécifique marquée à la fois dans les fractions soluble et insoluble. Cela confirme la production de l'enzyme HNK-1ST humaine par la souche recombinante sous forme soluble disponible dans le cytoplasme des bactéries.

Néanmoins, une différence de masse de 4 kDa suggère une dégradation en partie C-terminale de la HNK-1ST humaine, d'une trentaine d'acides aminés. Une étude plus avancée permettrait de

déterminer si cette dégradation est liée au protocole expérimental (aucun inhibiteur de protéases n'a été ajouté) ou si l'enzyme a subi une dégradation *in vivo* dans les bactéries, auquel cas elle ne serait pas active.

De nombreuses études ont montré une amélioration de l'expression et de la solubilité des protéines produites en fusion avec la Gluthation-S-Transférase (GST). L'activité enzymatique *in vitro* de la HNK1-ST de rat exprimée en fusion avec la protéine A dans des cellules COS a été également augmentée (Bakker, 1997).

Nos essais de sulfatation avec une souche recombinante sur-exprimant une protéine de fusion entre la GST et la HNK-1ST humaine synthétique n'ont pas permis de démontrer la synthèse de produits sulfatés. Toutefois, aucune (sur)production de cette protéine de fusion dans les bactéries n'a été détectée par immunorévélation .

Il est évident que, *in fine*, des tests enzymatiques permettant de détecter une activité sulfotransférases dans les bactéries induites sont nécessaires, bien que n'ayant pu être réalisés faute de temps.

2. GlcNAc-6ST

La sulfotransférase de mammifère HEC-GlcNAc6ST (CHST4) (domaine catalytique) est capable d'utiliser le motif GlcNAc-Gal-R aussi bien que l'accepteur sialylé (sialLacNac) et en moindre mesure l'accepteur sialyl LewisX (sLex) et peut permettre ainsi la biosynthèse du motif d'intérêt 6'-sulfo sialylLewisX (Bowman, 2001).

Nos essais de sulfatation sur l'accepteur le plus simple GlcNAc-Lac n'ont pas permis de démontrer d'activité de sulfatation *in vivo* de la part de la HEC-GlcNAc-6ST.

Un doute subsiste néanmoins concernant le composé **6** produit lors de la culture de la souche surexprimant la CHST4. Ce produit **6** n'a pas été caractérisé car n'ayant pas été retenu par la résine échangeuse d'anions Dowex 1x4, il n'a pas été considéré comme un produit chargé négativement et a été écarté. Cependant des problèmes de purification et de rétention d'oligosaccharides chargés grâce à cette résine ont été constatés ultérieurement. Une purification et une caractérisation du produit **6** sont nécessaires pour juger d'une activité éventuelle de la sulfotransférase CHST4 sur le motif accepteur GlcNAc-Lac.

Malgré une préférence démontrée de l'enzyme pour un résidu terminal GlcNAc, l'absence d'activité de sulfatation de l'enzyme pourrait provenir d'une mauvaise spécificité de l'enzyme. En effet, l'accepteur disaccharidique testé dans d'autres travaux porte une chaîne aliphatique au niveau anomérique, contrairement à l'accepteur trisaccharidique libre que nous avons testé. Comme pour la HNK-1ST, une production de la CHST4 hétérologue sous une forme inactive est possible. Une étude de l'expression et des tests d'activité enzymatique sont nécessaires pour compléter cette étude.

3. Hrv1373

L'enzyme encodée par le gène *rv1373* de *Mycobacterium tuberculosis*, exprimée sous une forme de protéine de fusion, a démontré une activité de 3-O-sulfatation envers des galactosylcéramides de type I et de type II qui présentent un motif galactosyle en position terminale (Rivera-Marrero, 2002). Bien que l'originalité et l'intérêt de la synthèse de ce motif ne soient pas primordiaux, nous avons testé cette enzyme en raison de son origine procaryote qui présageait de meilleures chances de succès pour une expression fonctionnelle chez *coli*.

Au cours de nos travaux, des essais de sulfatation de la RV1373 ont été réalisés mais aucun motif sulfaté n'a été détecté. Les accepteurs fonctionnalisés testés, choisis pour faciliter la détection et la purification, présentaient pourtant un motif galactosyle terminal ainsi qu'une partie C-terminale hydrophobe quasi identiques aux accepteurs décrits. Toutefois la légère différence de structure peut expliquer un manque de spécificité de l'enzyme. Des essais de sulfatation *in vivo* par la Rv1373 pourront être réalisés à partir de motifs commerciaux démontrés comme accepteurs.

4. KpsS

Au laboratoire, dans le cadre de la production de glycanes sulfatés chez *E.coli*, seule la chitoooligosaccharide sulfotransférase encodée par le gène *nodH* de *R.meliloti* a été démontrée active (Samain, 1999) et a permis la synthèse de facteurs de nodulation. La surexpression chez *E.coli* du gène *kpsS* de *Mesorhizobium loti* a permis de démontrer une sulfatation du KPS ainsi que du monosaccharide fucose (substituant proposé du KPS de *M.loti*) (Townsend, 2008).

Au terme de nos essais de sulfatation avec la KpsS chez *E.coli* sur un motif Fuc-Lac, aucun motif sulfaté n'a été détecté. La sulfotransférase KpsS, pourtant démontrée active sur le monosaccharide fucose, n'était peut-être pas active sur le motif Fuc-Lac. Le trisaccharide Fuc-Lac était peut-être trop volumineux pour intégrer le site de liaison de l'enzyme.

2. Ingénierie métabolique chez *S.cerevisiae*

Dans le procédé original d'usine cellulaire chez *E.coli* (Samain, 1997), les gènes codants pour différentes glycosyl-transférases sont introduits et exprimés dans des souches de bactérie ayant la capacité de synthétiser les glycosyl-nucléotides correspondants. On peut ainsi avoir un accès facile à de nombreux oligosaccharides de structure définie. Au cours de notre étude sur l'activité de sulfatation de STs chez *E.coli* (chapitre 1 précédent), nous avons sur-exprimé les séquences codantes de plusieurs STs dans des souches recombinantes d'*E.coli* mais aucune sulfatation n'a été détectée. Nous avons conclu entre autre à une possible production d'enzyme d'origine eucaryote inactive chez *E.coli*, corrélée à des défauts de modifications post-traductionnelles.

Nous avons voulu essayer de nous affranchir de ces problèmes liés aux modifications post-traductionnelles en exprimant les gènes de STs et de glycosyltransférases eucaryotes directement chez un organisme eucaryote. Ainsi nous avons fait le choix d'adapter le procédé de biosynthèse totale *in vivo* des oligosaccharides par ingénierie métabolique à la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Aucune étude n'a été réalisée concernant la co-expression de gènes encodant des glycosyltransférases chez la levure pour la synthèse *in vivo* de motifs oligosaccharidiques.

Naturellement, la plupart des STs eucaryotes possèdent des séquences d'adressage à destination de l'appareil de Golgi. Ces séquences signal peuvent être (mais pas nécessairement) localisés dans la séquence transmembranaire en position Nt. La stratégie d'expression des GTs *in vivo* chez *S.cerevisiae* présentait donc deux approches possibles : 1- conserver une localisation golgienne en préservant l'intégralité de la protéine; ou 2- opter pour un adressage des enzymes tronquées, afin d'espérer une localisation cytoplasmique. Nous avons privilégié la production des glycosyltransférases/sulfotransférases dans le cytoplasme sous forme soluble en tronquant, quand cela est possible, les séquences codantes pour les signaux d'adressage des gènes. Cette stratégie se rapproche plus de celle utilisée chez *E.coli*, où toutes les enzymes de modification sont produites dans le cytoplasme de la bactérie.

De plus chez *S.cerevisiae*, les différents UDP-sucres et le PAPS, nécessaires à la synthèse des glycanes, sont également disponibles dans le cytosol, lieu de leur synthèse (Prydz, 2000).

Au cours de cette étude, nous avons d'abord sur-exprimé le gène *lac12* de *K.lactis* chez la souche de *S.cerevisiae*. Le produit du gène, une lactose perméase, a permis l'internalisation et l'accumulation du lactose dans le milieu intracellulaire, alors que la souche sauvage n'en est pas capable. La production d'une telle souche recombinante de *S.cerevisiae* est une première et permet surtout d'envisager des tests de glycosylation/sulfatation sur cet accepteur grâce à la sur-expression de glycosyltransférase/sulfotransférase chez la levure.

La souche sauvage de *S.cerevisiae* n'est pas capable de réaliser la biosynthèse le donneur UDP-GlcA, nécessaire à une bonne activité de la GlcA-transférase sur le lactose (Oka, 2007). Malgré la sur-expression du gène *kfiD* d'*E.coli* K5, encodant une UDP-Glc déshydrogénase, aucun donneur n'a été détecté. L'absence de détection peut être due à la faible concentration d'UDP-GlcA produit et détectable par CCM, témoignant d'une faible activité de l'enzyme KfiD. Le choix d'exprimer le gène *kfiD*, décrit actif chez *E.coli* (Yavuz, 2009), n'a pas été judicieux vis-à-vis d'une stratégie de biosynthèse chez un organisme eucaryote.

Un gène analogue d'origine eucaryote comme celui d'*Arabidopsis thaliana*, présentant de nombreuses homologies de séquence avec *kfiD*, a déjà fait l'objet d'une telle étude, et aurait dû être préféré au choix que nous avons fait, à ceci près que nous ne disposions pas de ce gène.

Un essai de glucuronylation *in vivo* chez la levure de la GlcAT-P de souris à partir du lactose n'a pas permis de détecter de produit glucuronylé. Le fait que le donneur UDP-GlcA, indispensable, ne soit peut-être pas disponible pourrait expliquer en grande partie cette absence de glucuronylation. Cependant il est clair que des études complémentaires mettant en œuvre des tests enzymatiques et de localisation cellulaire sont nécessaires pour appréhender une suite à ce travail.

Un essai de glucosaminylation *in vivo* chez la levure grâce à la surexpression de la GlcNAc transférase LgtA de *Neisseria meningitidis* n'a pas produit de composé modifié. Ceci constituait un prélude à l'expression de GlcNAc STs, qui nécessitent un oligosaccharide accepteur portant un résidu GlcNAc en position distale. L'activité de LgtA chez *E.coli* avait été démontrée à partir du même accepteur lactose (Priem, 2002), Le choix de la nature bactérienne a été fait pour tenter de s'affranchir des problèmes d'adressage, en espérant une sécrétion dans le cytoplasme.

Finalement la culture de la souche recombinante de *S.cerevisiae* sur-exprimant le gène *gal3-ST2* humain, qui encode une Gal-3-O-sulfotransférase, n'a pas permis la production de composé sulfaté sur le lactose. Pourtant, synthétisée dans des cellules eucaryotes COS-1, la protéine recombinante encodée par *gal3ST2* a des activités de sulfatation *in vitro* envers le lactose (Honke, 2001). L'absence ou le manque de donneur de sulfate, le PAPS, dans les levures peut expliquer l'absence d'activité de sulfatation de la Gal3ST2, même si nous avons pris la précaution de travailler en milieu minimum, critère de synthèse endogène de ce précurseur de sulfatation. Il est évident qu'ici, le problème de l'adressage est peut-être celui à appréhender en priorité pour donner une suite à ce travail.

3. Toxicité du PAPS

Le PAPS est le donneur universel de sulfate pour la plupart des enzymes sulfotransférases (Klaasen, 1997). Nous savons que le donneur sulfaté PAPS est disponible dans la bactérie pour être parvenu à la sulfatation d'un squelette de facteur de nodulation il y a plusieurs années (Samain, 1999).

Au cours de nos travaux, nous avons cloné et sur-exprimé dans nos souches d'*E.coli* les gènes *nodP* et *nodQ* de *R.meliloti*, encodant les enzymes ATP sulfurylase et APS kinase, pour régénérer *in vivo* le PAPS. Malheureusement des problèmes de croissance et de mortalité ont été constatés chez ces souches. L'expression naturelle de ces gènes chez *R.meliloti* (deux copies du gène) est bien inférieure à celle dans nos souches recombinante (une trentaine de copies) et cette surexpression des enzymes entraîne sans doute une surproduction du PAPS, responsable de la mortalité des bactéries. Cela confirme des études démontrant une toxicité du PAPS (Neuwald, 1992).

Il est donc clair que la sélection de sulfotransférases possédant un très faible K_M pour le PAPS est à privilégier plutôt que de tenter d'augmenter la concentration de celui-ci, en raison de cette toxicité.

4. Synthèse chimio-enzymatique d'un analogue de l'épitope HNK-1

La synthèse d'un trisaccharide 3-O-sulfo-glucuronyle lactose, analogue de l'épitope HNK-1, a été réalisée grâce à une approche combinée enzymatique et chimique. La glucuronylation du motif lactoside d'allyle a d'abord été réalisée dans une souche génétiquement modifiée d'*E.coli* surexprimant les gènes *glcAT* et *kfiD*. La sulfatation chimique régiosélective du trisaccharide résultant a fourni un analogue de type HNK-1, qui a été conjugué à l'albumine de sérum bovin par amination réductrice après ozonolyse du groupe allyle.

Là où la sulfatation enzymatique a échoué, la sulfatation chimique a été une réussite. Cependant même si cette stratégie originale, la seule permettant la synthèse d'un motif analogue sulfaté d'intérêt, a été publiée (Bastide, 2010), la durée et la complexité des réactions chimiques imposent des recherches d'activité de STs chez *E.coli* afin de réaliser la biosynthèse totale *in vivo* de cet analogue de l'épitope HNK-1.

La seule détection de l'analogue sulfaté de l'épitope HNK-1, porté par la néoglycoprotéine, en test ELISA par trois anticorps HNK-1, confirme l'intérêt potentiel de cet analogue synthétique. Premièrement cela confirme le fait que la présence de sulfate est une condition indispensable à la détection du motif oligosaccharidique par un anticorps HNK-1. Ensuite, la reconnaissance par les anticorps en dépit de l'absence du groupe acétamido en raison du remplacement du GlcNAc par le Glc dans ce composé synthétique, corrobore une étude précédente qui avait montré qu'un minimum de deux sucres 3-O-sulfo- β GlcA(1 \rightarrow 3)- β Gal- sur un céramide avait été suffisant pour une reconnaissance des anticorps HNK-1 (Tokuda, 1998).

La détection d'une activité de sulfatation par la HNK-1ST peut être envisagée grâce à cette reconnaissance spécifique de structures sulfatées par les anticorps HNK-1. Des tests d'inhibition ELISA pourraient permettre de détecter d'éventuels composés sulfatés produits *in vivo*.

Enfin notre choix de synthèse expéditive de l'analogue du HNK-1, combinée à sa réactivité biologique, sont des points prometteurs pour l'utiliser comme un précurseur de composés élaborés comme les biomatériaux pour des applications en ingénierie tissulaire. Une étude préliminaire, réalisée grâce à une collaboration avec un institut de neurobiologie, a d'ailleurs permis d'envisager un avenir prometteur à ces néoglycoconjugués pour la régénération et la croissance des cellules nerveuses.

5. Détection et purification des glycanes sulfatés

Quelques problèmes de purification des oligosaccharides chargés ont été constatés au cours de notre travail sur des résines échangeuses d'anions et sur charbon actif.

La méthode de purification de nos oligosaccharides la plus efficace a été celle réalisée par chromatographie d'exclusion sur une colonne de gel HW40.

Une technique de criblage des activités de sulfatation a été tentée au cours de nos travaux (résultats non montrés). La présentation de surface bactérienne (« LPS surface display ») permet d'immobiliser la structure oligosaccharidique produite à la surface de la bactérie. Dans ce cas, l'utilisation d'anticorps peut permettre la sélection des bactéries qui expriment les gènes d'intérêt par interaction directe et spécifique (fig 72).

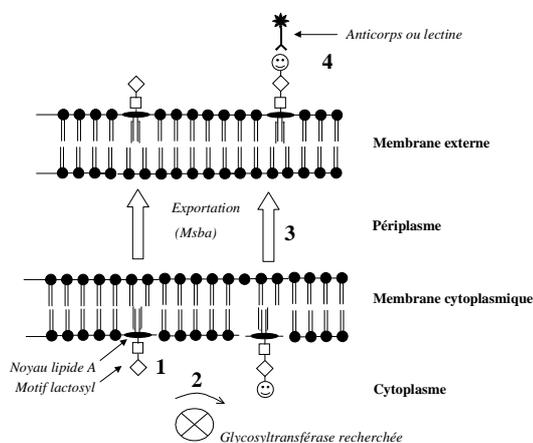


Figure 72 : Principe de la recherche d'activités glycosyltransférases pour la production d'oligosaccharides recombinants

Appliqué à la biosynthèse de l'oligosaccharide sialyllactosyl, cette technique a permis de détecter des motifs oligosaccharidiques modifiés à la surface des bactéries (Ilg, 2010). Nous avons essayé de l'appliquer à la détection d'activité de sulfatation de la HNK-1ST sans succès. Mais il est impossible de conclure entre une absence d'activité enzymatique et un problème possible d'exportation de structures chimériques fixées au lipide A.

L'utilisation d'accepteurs fonctionnalisés avec un groupement propargyle en partie anomérique peut éventuellement améliorer la détection des glycanes modifiés. La click chemistry, addition polaire entre un azide et un alcène terminal, conduit à la formation d'une liaison très stable (fig 73).

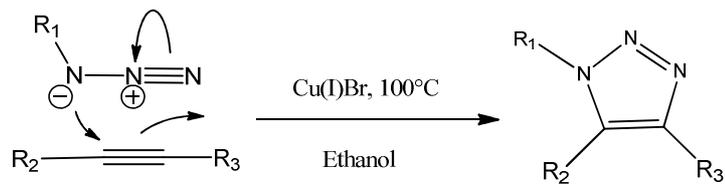


Figure 73 : principe de la click chemistry

La click chemistry permettrait un couplage sélectif des oligosaccharides fonctionnalisés modifiés avec des composés facilement identifiables (fluorescent, luminescent, ...). Ainsi, même produits en faible quantité, des oligosaccharides fonctionnalisés modifiés pourraient être détectés au sein d'un mélange non purifié.

Des essais de click chemistry sur des fractions oligosaccharidiques extracellulaires n'ont malheureusement pas été concluants certainement dû à une concentration en ions trop importante dans les extraits analysés. Afin d'améliorer cette approche, un dessalage sommaire précédent le couplage des molécules propargylées est nécessaire.

MATERIELS ET METHODES

I. Construction des souches recombinantes

1. Méthodes de biologie moléculaire

Ces méthodes sont réalisées selon les protocoles établis par Sambrook et *al.*

1. Clonage des gènes

Les gènes qui codent pour les différentes sulfotransférases et glycosyltransférases utilisées et n'appartenant pas à notre collection d'ADN, ont été tout d'abord amplifiés à partir du génome des espèces par PCR (Polymerase Chain Reaction). Lors de cette étape de polymérisation, on utilisait une enzyme, la Vent polymérase (BioLabs), qui possède une forte fidélité lors de la polymérisation des brins d'ADN formés de manière à éviter les erreurs de répllication des gènes. Des paires d'amorces oligonucléotidiques spécifiques ont également été nécessaires au cours de cette étape, elles permettent d'intégrer en amont et en aval du gène amplifié des sites de restriction qui faciliteront les sous-clonages ultérieurs dans les vecteurs d'expression. Le design de ces amorces permet également l'insertion, en amont du codon initiateur ATG du gène, d'un site de fixation aux ribosomes. A l'issue de la PCR, les produits PCR ont été séparés sur gel d'agarose par électrophorèse puis purifiés par un kit d'extraction d'ADN (NucleoTrap® de Macherey-Nagel) selon le protocole fourni avec le kit. L'ADN purifié a été ensuite introduit dans le vecteur de clonage PCR4blunt-TOPO du kit de clonage Zero Blunt TOPO d'Invitrogen par ligation avec la T4 Ligase. Ce clonage direct du produit de PCR a été possible grâce aux extrémités franches du vecteur pCR4blunt-TOPO. Après transformation dans des souches TOP 10, les clones positifs ayant intégrés le plasmide recombinant ont été pré-sélectionnés grâce à la résistance aux antibiotiques Ampicilline et Kanamycine apportées par le vecteur pCR4blunt-TOPO. En parallèle le vecteur pBlunt possède en aval du site d'insertion du produit de PCR le gène *ccdB* qui code pour une protéine toxique : seuls les clones ayant intégré le produit PCR sont viables, la synthèse de la protéine toxique n'étant pas réalisée. Une vérification supplémentaire, un screening, des clones pré-sélectionnés a été réalisée grâce à une nouvelle amplification PCR sur colonie. On a utilisé les mêmes amorces que lors de la première amplification et la Taq Polymérase (Invitrogen), moins fidèle mais plus efficace. L'ADN plasmidique des clones positifs a été ensuite isolé par purification grâce au kit QIAprep® Spin Miniprep (QIAGEN) selon le protocole fourni avec le kit. Finalement la séquence du plasmide purifié a été obtenue et vérifiée par séquençage effectué par Cogenics.

Le domaine catalytique du gène humain *chst4*, ou appelé aussi HEC-GlcNAc6ST (EMBL/Gen-Bank/DDBJ accession nos.AF131325), codant pour une 6-*O*-Nacétylglucosamine sulfotransférase (Bistrup, 1999) a été amplifié à partir du plasmide HuGST3 (fourni par Bistrup) par PCR avec les amorces GNST2-13-TCTAGATTAGTGGATTTGCTCAGGGA (KpnI, sens) et

GNST2-15-GGTACCTTAGGAGGTCACATATGAAGGCACAGCCCGAGCGCATG (XbaI, antisens). Après clonage dans le vecteur pCRBlunt, le plasmide obtenu est désigné par pBlunt-*chst4*.

Le gène *lac12* (XO6997), codant pour une lactose perméase (Chang, 1988) a été amplifié par PCR de la souche NRRL Y-1140 de *Kluyveromyces lactis* (284590) à l'aide des amorces LAC5-TTGGGCCCTTTCAAATGGCAGATCATTTC (ApaI, sens) et LAC3-AAGCTAGCTTTAAACAGATTCTGCCTCTG (NheI, antisens). L'amplicon de 1788 bp est cloné dans le vecteur pCRBlunt, le plasmide obtenu est désigné par pBlunt-*lac12*.

Le gène *nodP1* (SMa0855), codant pour la petite sous-unité d'une ATP-sulfurylase (Schwedock, 1994) a été amplifié par PCR de l'ADN total de *Sinorhizobium meliloti* 1021 à l'aide des amorces NODP5-GCGCGGTACCGAAGTCGCGTCCGCCGTTGCGTAT (KpnI, sens) et NODP3-ATAAAGCTTCGCATCGTAAAGCAGTCGCCCGATC (HindIII, antisens); ces amorces ont été construites à partir de celles utilisées par Schwedock. L'amplicon de 1569 bp a été cloné dans le vecteur pCRBlunt, le plasmide obtenu est désigné par pBlunt-*noDPI*.

Le gène *nodQ1* (SMa0857), codant pour la grande sous-unité d'une ATP-sulfurylase et une APS-kinase (Schwedock, 1994), a été amplifié par PCR de l'ADN total de *Sinorhizobium meliloti* 1021 à l'aide des amorces NODQ5-AAGCTTGTCTTCGAAGACCAGCTCGCAAACCTCGGGCGTGTCGGCTCT (HindIII, sens) et NODQ3-GCGCTCTAGACCGGGACCATATAGACAGAACATCCAGTTC (XbaI, antisens); ces amorces ont été construites à partir de celles utilisées par Schwedock. L'amplicon de 1893 bp a été cloné dans le vecteur pCRBlunt, le plasmide obtenu est désigné par pBlunt-*noDQ1*.

Le domaine catalytique du gène *hnk1ST* (EDL99206), codant pour une 3-O-glucuronyl-sulfotransférase (HNK1ST OU CHST10) (Bakker, 1997) a été amplifié à partir d'ADN de *Rattus norvegicus* par PCR une première fois avec les amorces HSTL5-TCCGTGATGGAAAATGTGAA (sens) et HSTL3-ATCAGAGCCCAACATCATCC (antisens). Le mix PCR contenant un amplicon de 1250 bp est utilisé pour une seconde amplification par PCR est réalisée à l'aide des amorces HST35-AAGGGTACCGAGGTCACATATGCCGGATGGGTATAGTGCCAAACA (KpnI, sens) et HST23-GATATCTTAATTTACAAGAAATCTGGTTTCTGATACCCAA (EcoRV, antisens). L'amplicon de 1006 bp est cloné dans le vecteur pCRBlunt, le plasmide obtenu est désigné par pBlunt-*hnk1STr*.

Le fragment génique du gène *hnk1STr* a été muté (Guanine 692 en adénine) par le protocole de mutation ponctuelle par mutagenèse (PMM) par PCR à partir de l'ADN plasmidique de pBlunt-*hnk1STr* avec les amorces STCORE5-CTGAGGTCACCCAGTGGATGATATGGTCCCC et STCORE3-GGGGACCATATCATCCACTGGGTGACCTACG. Le mix PCR a été digéré avec DpnI pour digérer l'ADNs parental super-enroulé et transformé dans des cellules compétentes Top10 pour former le plasmide pBlunt-*hnk1STrM*.

Le fragment génique du gène *hnk1STrM* a été amplifié par PCR à partir du plasmide pBlunt-*hnk1STrM* à partir des amorces ST5P1-GGCACACCATGGGTGCCGGATGGGTATAGTGCCA (NcoI, sens) et ST3P1-GGGTCTAGAGATATCCTATTAATTTAGCAAGAAATCTG (XbaI,

antisens). L'amplicon de 999 bp est inséré dans le vecteur de clonage pCRBlunt pour former le plasmide pBlunt-*hnk1STPF1*.

Le fragment génique du gène *glcAT-P* a été amplifié par PCR à partir du plasmide pBS-*glcAT* (Yavuz,2008) à partir des amorces Glc5P1-ACAGGTACCGTAAGGAGATATACATATGCTGCCC (KpnI, sens) et Glc3P1-GGGCCATGGGCCGCCGATCTCCCACTGAGGGGGTCGGT (NcoI, antisens). L'amplicon de 791 bp est inséré dans le vecteur de clonage pCRBlunt pour former le plasmide pBlunt-*glcATPF1*.

Le fragment génique du gène *hnk1STrM* a été amplifié par PCR à partir du plasmide pBlunt-*hnk1STM* à partir des amorces ST5P2-ACAGGTACCGTAGAGGTCACATATGCCGGATGGG (KpnI, sens) et ST3P2-GGGCCATGGGCCGCCATTTAGCAAGAAATCTGGTTTC (NcoI, antisens). L'amplicon de 1007 bp est inséré dans le vecteur de clonage pCRBlunt pour former le plasmide pBlunt-*hnk1STPF2*.

Le fragment génique du gène *glcAT-P* a été amplifié par PCR à partir du plasmide pBS-*glcAT* à partir des amorces Glc5P2-GGCACACCATGGGTGCTGCCACCATCCATGTG (NcoI, sens) et Glc3P2-GGGTCTAGAGATATCTATCAGATCTCCCACTGAGGGGTC (XbaI, antisens). L'amplicon de 780 bp est inséré dans le vecteur de clonage pCRBlunt pour former le plasmide pBlunt-*glcATP2*.

Le domaine catalytique du gène *hnk1ST* (NP004845), codant pour une HNK-1ST humaine (Ong, 1998), a été synthétisé par l'entreprise Genscript (USA). Un fragment génique a été synthétisé à partir de la séquence peptidique de façon à optimiser l'expression dans *E.coli* et dans *S.cerevisiae*, notamment le choix de la nature des codons. Il a été inséré entre les sites SacI et BamHI du vecteur pUC 18 pour former le pUC-*hnk1STS*.

Le gène *hnk1STS* est amplifié à partir du plasmide synthétique pUC-*hnk1STS* par PCR avec les amorces 5HNKSTS-CGAGGATCCCCAGAAGTTCGTAAACTGCCAGAAGAAAAACA (BamHI, sens) et 3HNKSTS-CAGGAATTCTTAATTCAGCAGAAAATCTGGTTTTTGATAAC (EcoRI, antisens). Après clonage dans le vecteur pCRBlunt, le plasmide est désigné par pBlunt-*hnk1STS-Gex*.

Le domaine catalytique du gène *gal3ST2* (Q3H3Q3), codant pour une galactose-3-O-sulfotransférase 2 (G3ST2) (Honke, 2001) a été amplifié à partir d'ADN humain par PCR avec les amorces 3ST25-ATCTAGAGGTCTAATATGCACCTGGACTTAGAGCTGGAC (XbaI, sens) et 3ST23-CAAGCTTCCTCTACGCCCCAGGACG (HindIII, antisens). L'amplicon de 1170 bp est cloné dans le vecteur pCRBlunt, le plasmide obtenu est désigné par pBlunt-*gal3ST2*.

Le domaine catalytique du gène *kfiD* (ZP04005453), codant pour une UDP-glucose déshydrogénase de *E.coli* (Yavuz, 2008) a été amplifié par PCR à partir du plasmide pBS-*glcAT-kfiD* (Yavuz, 2008) à l'aide des amorces KFS5- TTGGGCCCTTTGGGGCTATATAAAATGTTTCG (ApaI, sens) et KFS3-AAGCTAGCCGGCCGCACTAGTGATTTAG (NheI, antisens). L'amplicon de 1223 bp a été cloné dans le vecteur pCRBlunt, le plasmide obtenu est désigné par pBlunt-*kfiDS*.

Le gène *lgtB* (AAC44085), codant pour une β 1-4 galactosyltransférase de *Neisseria meningitidis* (Jennings, 1995) a été amplifié par PCR à partir du plasmide pLNTR à l'aide des amorces Lgtb5-AGGATCCATGCAAACCACGTTATCAGCTTAGCTTC (BamHI, sens) et Lgtb3-TGTCGACTTATTGGAAAGGCACAATGAACTGTTCGC (SalI, antisens). L'amplicon de 842 bp est inséré dans le vecteur de clonage pCRBlunt pour former le plasmide pBlunt-*lgtBS*

Le fragment génique du gène *glcAT-P* a été amplifié par PCR à partir du plasmide pBS-glcAT à partir des amorces Glc5SC-TTATCGATACATATGCTGCCACCATCCATGT (ClaI, sens) et Glc3SC-TTTTAATTAATTCATCAGATCTCCACTGAGGGGTC (PacI, antisens). L'amplicon de 788 bp a été inséré dans le vecteur de clonage pCRBlunt pour former le plasmide pBlunt-*glcATS*.

Le gène *hrv1373* (NP_215889), codant pour une glycolipide sulfotransférase (EC 2.8.2.-) de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, a été amplifié par PCR à partir d'ADN génomique de la souche de *M. tuberculosis* à l'aide des amorces RV5-TCTAGAGGTCTAATATGAATTCAGAACACCCGATGACC (XbaI, sens) et RV3-CTGCAGTCAGTTGGCCGGTTCGTATCC (PstI, antisens). L'amplicon de 1001 bp a été cloné dans le vecteur de clonage pCRBlunt pour former le plasmide pBlunt-*rv1373*.

Le gène *kpsS* (NP_107853.1) de *Mesorhizobium loti*, codant pour une sulfotransférase, a été synthétisé par Genscript. Il a été inséré entre les sites XbaI et PstI du vecteur pUC19 pour former le pUC-*kpsS*.

2. Sous-clonage des gènes dans les vecteurs d'expression

a) Expression chez *E.coli*

Les gènes d'intérêt ont été ensuite sous-clonés dans différents vecteurs d'expression (tableau 9) à partir des plasmides de clonage ou à partir de plasmides déjà existants au laboratoire, par digestion par des enzymes de restriction. Les gènes ont été intégrés dans divers plasmides, sous le contrôle d'un promoteur pLac ou pTac et portant des gènes de résistances à différents antibiotiques. Le nombre de copie des plasmides permet de réguler l'expression des gènes et de gérer ainsi les différentes activités des enzymes entre elles.

Vecteur	Clonage	Promoteur	Origine de réplication	Résistance	Nombre de copies	Références
pCR4Blunt	Clonage		colE1	Amp,Kan	Fort	Invitrogen
pBlueScript KS	Expression	pLac	colE1	Amp	Fort	Invitrogen
pACT ₃	Expression	pTac		Ch		(Dykxhoorn, 1996)
pSU 2718	Expression	pLac	p15a	Ch	Moyen	(Yanish-Perron, 1985)
pUC 18	Expression	pLac	colE1	Amp	Fort	(Martinez, 1988)
pBBR3	Expression	pLac		Tet	Faible	(Kovac, 1995)
pGEX	Expression			Amp		

Tableau 9: Liste des vecteurs utilisés lors des clonages chez *E.coli*

Le gène *hnk1STS* a été libéré du plasmide pBlunt-*hnk1STS-Gex* par une double digestion avec BamHI et EcoRI. Il a été ensuite inséré dans le vecteur d'expression pGEX digéré BamHI et EcoRI pour former le plasmide pGEX-*hnk1STS*.

Le gène *hnk1STrM* a été libéré du plasmide pBlunt-*hnk1STrM* par une double digestion avec KpnI et XbaI et inséré dans les vecteurs d'expression pBBR3 et pACT3 pour donner respectivement les plasmides pBBR-*hnk1STrM* et pACT-*hnk1STrM*.

Le gène *hnk1STrM* a été libéré du plasmide pBlunt-*hnk1STrM* par une double digestion avec EcoRV et SpeI et inséré en amont du gène *glcAT-P* dans le plasmide pBS-*glcAT* digéré par EcoRV. Le plasmide pBS-*hnk1STrM-glcAT* a été obtenu.

Le gène *chst4* a été libéré du plasmide pBlunt-*chst4* par une double digestion avec KpnI et XbaI et inséré dans le vecteur d'expression pBlueScript KS pour donner le plasmide pBS-*chst4*.

Le gène *rv1373* a été libéré du plasmide pBlunt-*rv1373* par une double digestion avec PstI et NotI et inséré dans le vecteur pBlueScriptKS digéré avec PstI et NotI. Le plasmide pBS-*rv1373* a été obtenu.

Le fragment génique *nodP1* (1562 bp) a été libéré du plasmide de clonage pBlunt-*nodP1* par une double digestion KpnI et HindIII, et le fragment génique *nodQ1* (1868 bp) a été libéré du plasmide de clonage pBlunt-*nodQ1* par digestions HindIII et XbaI. Le fragment génique *nodQ1* a été inséré à la suite du fragment génique *nodP1* dans le vecteur de clonage pCRBlunt par ligation trois fragments pour former le plasmide final pBlunt-*nodQP*.

Le fragment génique *nodPQ*, contenant les gènes *nodP1* et *nodQ1*, a été libéré du plasmide pBlunt-*nodPQ* par une double digestion avec KpnI et XbaI et a été inséré dans les vecteurs d'expression pACT3 et pBBR3 (digérés KpnI et XbaI) pour former respectivement les plasmides pACT-*nodPQ* et pBBR-*nodPQ*.

Le fragment génique *glcAT-kfiD*, contenant les gènes *glcAT-P* et *kfiD*, a été libéré du plasmide pBS-*glcAT-kfiD* (Yavuz, 2008) par une double digestion KpnI-HindIII et inséré dans le vecteur d'expression pACT3 pour former le plasmide final pACT-*glcAT-kfiD*.

Le fragment génique *kfiD* (1466 bp) a été supprimé du plasmide accepteur pACT-*glcAT-kfiD* par une digestion PstI, le plasmide pACT-*glcAT* a été construit.

Le gène *kfiD* a été libéré du plasmide pBS-*glcAT-kfiD* par une digestion PstI et inséré dans le vecteur d'expression pBBR3 digéré PstI et déphosphorylé pour former le plasmide pBBR-*kfiD*.

Le gène *glcAT-P* a été libéré du plasmide de clonage pBlunt-*glcATPF1* par une double digestion KpnI et NcoI et le gène *hnk1STrM* est libéré du plasmide pBlunt-*hnk1STPF1* par digestions par NcoI et XbaI. Puis le gène *hnk1ST* a été inséré à la suite du gène *glcAT-P* en fusion dans le vecteur d'expression pBlueScript KS (digéré KpnI et XbaI) par une ligation trois fragments pour former le plasmide final pBS-*glcAT-hnk1ST-PF1*.

Le gène *hnk1STrM* a été libéré du plasmide de clonage pBlunt-*hnk1STPF2* par une double digestion KpnI et NcoI et le gène *glcAT-P* a été libéré du plasmide pBlunt-*glcATPF2* par digestions

par NcoI et XbaI. Puis le gène *glcAT-P* a été inséré à la suite du gène *hnk1ST* en fusion dans le vecteur d'expression pBlueScript KS (digéré KpnI et XbaI) par une ligation trois fragments pour former le plasmide final pBS-*hnk1st-glcAT*-PF2.

Le gène *hnk1STS* a été libéré du plasmide pBlunt-*hnk1STS-Gex* par double digestion BamHI et EcoRI et inséré dans le vecteur d'expression pGex pour former le plasmide pGex-*hnk1STS*.

b) Expression chez *Saccharomyces cerevisiae*

Les gènes d'intérêt ont été sous-clonés dans différents vecteurs d'expression pESC de Invotrogen (tableau x) à partir des plasmides de clonage ou à partir de plasmides déjà existants au laboratoire, par digestion par des enzymes de restriction. Les gènes ont été intégrés dans les différents plasmides pESC, sous le contrôle des promoteurs chez la levure GAL1 ou GAL10 en sens opposé. Chacun des vecteurs pESC contient un des quatre différents marqueurs de sélection chez la levure (HIS3, TRP1, LEU2, ou URA3) dans la même région du vecteur, ce qui permet une expression de deux gènes différents dans une simple cellule de levure. Les vecteurs pESC sont des plasmides épisomaux de levure (YEps) qui utilisent le backbone de phage pBluescript II SK(+) et une origine de répllication de plasmide pUC et un gène de résistance à l'ampicilline, ce qui permet une répllication et une sélection chez E.coli.

Le gène *lac12* a été libéré du plasmide pBlunt-*lac12* par digestions ApaI et NheI et inséré dans le vecteur d'expression pESC-Leu pour former le plasmide final pESC-Leu-*lac12*.

Le gène *kfiD* a été libéré du plasmide pBlunt-*kfiDS* par digestions ApaI et NheI et inséré dans le vecteur d'expression pESC-Trp pour former le vecteur final pESC-Trp-*kfiD*

Le gène *glcAT-P* a été libéré du plasmide pBlunt-*glcATS* par double digestion avec PacI et ClaI et inséré dans le vecteur pESC-Trp-*kfiD* pour former le vecteur final vecteur pESC-Trp-*glcAT-kfiD*.

Le fragment génique contenant les gènes *glcAT* et *kfiD* sous le contrôle des promoteur GAL 1 et GAL10 de 4498 bp a été libéré du vecteur pESC-Trp-*glcAT-kfiD* par digestion avec BglII et transféré dans le vecteur d'expression pESC-Ura (digéré BglII et délété du fragment génique contenant les promoteurs) pour former le vecteur final vecteur pESC-Ura-*glcAT-kfiD*.

Le gène *gal3ST2* a été libéré du plasmide pBlunt-*gal3ST2* par digestions XbaI et HindIII et inséré dans le vecteur d'expression pESC-His pour former le plasmide final pESC-His-*gal3ST2*.

Le gène *lgtA* a été libéré du plasmide pSU-*lgtA* par digestion avec EcoRI et inséré dans le vecteur d'expression pESC-His pour former le plasmide final pESC-His-*lgtA*.

Le gène *lgtB* a été libéré du plasmide pBlunt-*lgtBS* par double digestion avec BamHI et Sall et inséré dans le vecteur pESC-His-*lgtA* pour former le vecteur final pESC-His-*lgtA-lgtB*.

2. Cellules hôtes

1. Bactéries *E.coli*

Les bactéries utilisées pour la production des oligosaccharides d'intérêt dérivant de la souche d'*E.coli* K12 (U00096) sont rassemblées dans le tableau 10.

Souches	Caractéristiques	Origine
DH1	F- supE44 recA1 endA1 gyrA96 (Nalr) thi1 hsdR17 relA1	DSM 4235
ZLK	DH1 $\Delta lacZ$ <i>wcaF::Plac</i> $\Delta nanKETA$	labo
ZLKA	ZLK $\Delta lacA$	labo
ZW	ZLKA $\Delta melA$ $\square wcaJ$	labo
Gènes	Activité codée	Références
<i>lacZ</i>	β -galactosidase	(Dumon, 2004)
<i>lacA</i>	Thiogalactoside transacétylase	(Dumon, 2006)
<i>melA</i>	α -galactosidase	(Bettler, 2003)
<i>nanA</i>	NeuAc-aldolase	(Fierfort, 2008)
<i>wcaJ</i>	Glucose-1-phosphate transférase	(Dumon, 2001)

Tableau 10 : bactéries hôtes et leurs gènes mutés utilisés dans cette étude.

La souche ZW utilisée dans cette étude provient du laboratoire où elle permet la production des oligosaccharides. Elle possède des mutations qui concernent les gènes responsables du catabolisme des molécules à internaliser dans la bactérie pour initier la synthèse. La délétion dans la séquence du gène *lacZ* fait perdre à la souche ZW son activité β -galactosidase. Le gène *lacA* est également muté dans cette souche pour empêcher l'acétylation des β -galactosides accepteurs. Ces deux premières mutations permettent de garder le lactose intact et son utilisation comme accepteur.

2. Levure *S.cerevisiae*

Plusieurs souches de levures (*Kluyveromyces lactis* et *Saccharomyces cerevisiae*) ont été testées durant ces travaux (résultats non montrés) mais seuls les travaux avec la souche de *S.cerevisiae* W303 pour la production d'oligosaccharides d'intérêt ont été intéressants. Cette souche W303 est décrite par le génotype *Mata, ade2-101, his3-11-15, leu2-3-112, trp1-1, ura3-1*.

3. Préparation des cellules compétentes et transformation

1. Préparation des bactéries compétentes

Deux méthodes ont été utilisées pour réaliser dans les bactéries *E.coli* la transformation des plasmides d'expression et de clonage. La méthode d'Inoué et al. (1990) avec le tampon TB est la méthode la plus efficace permettant une transformation de plasmide difficile. La méthode de Chung et al. (1989) avec le tampon TSS permet un protocole plus rapide pour des transformations plus routinières.

a) *Méthode avec le tampon TB*

Les souches d'*E.coli* sont repiquées la veille à partir d'une colonie isolée sur LB agar dans 10 mL de LB liquide avec antibiotique et mis en culture sous agitation la nuit à 37°C. Le matin on inocule au 1/50^{ème} les souches dans 10 mL de SOB (2% Tryptone, 0.5% Yeast Extract, 0.05% NaCl, 0.02% KCl, pH 7.0) et mises en culture sous agitation à 28°C jusqu'à obtenir une DO₆₀₀ comprise entre 0.4 et 0.6. Dans des microtubes de 2 mL elles sont centrifugées à 13000 g pendant 15 secondes à température ambiante. Le culot est resuspendu doucement dans 600 µL de tampon TB glacé (PIPES 10 mM, CaCl₂ 2 H₂O 15 mM, KCl 250 mM, MnCl₂ 4H₂O 55 mM, pH 6.7). Les tubes sont incubés 20 minutes dans la glace. Après une nouvelle centrifugation des tubes à 13000 g pendant 15 secondes à 0°C, le culot est repris dans 150 µL de tampon TB glacé et on ajoute 10 µL de DMSO. On incube la solution dans la glace pendant 10 minutes. Les bactéries devenues compétentes sont plongées dans un bain d'azote liquide et conservées à -80°C jusqu'à leur utilisation.

b) *Méthode avec le tampon TSS*

Les souches d'*E.coli* sont repiquées la veille à partir d'une colonie isolée sur LB agar dans 10 mL de LB liquide avec antibiotique et mis en culture sous agitation la nuit à 37°C. Le matin on inocule au 1/50^{ème} les souches dans 10 mL de SOB et mises en culture sous agitation à 28°C jusqu'à obtenir une DO₆₀₀ comprise entre 0.4 et 0.6. Dans des microtubes de 2 mL, elles sont centrifugées à 13000 g pendant 15 secondes à température ambiante. Le culot est cette fois resuspendu dans 1mL de TSS froid (10% PEG (poids/vol, MW 6000), 5% DMSO (vol/vol), 50mM MgCl₂, milieu LB 85%, pH 6.5). Aliquoter la suspension par 150 µL en microtubes de 1.5 mL, congeler les tubes en les plongeant dans l'azote liquide et les conserver à -80°C jusqu'à leur utilisation (< 2 semaines).

2. Transformation des bactéries

La transformation bactérienne est réalisée avec 100 µL de bactéries compétentes et 2 à 5 µL de chaque plasmide à intégrer. On place le mélange dans la glace pendant 20 minutes puis à 42°C pendant 2 minutes. On ajoute 400 µL de SOC (SOB additionné de 2% Glucose 1M et 1% MgSO₄ 1M) et on incube les bactéries pendant 1 heure à 37°C. On reconcentre les bactéries dans 100 µL de solution par centrifugation 4 minutes à 4000 g et on étale sur LB agar additionné des antibiotiques appropriés. On incube à 37°C pendant la nuit.

3. Préparation des levures compétentes

Selon la méthode fournie par Invitrogen avec les vecteurs pESC, les transformations de levure sont effectuées par l'acétate de lithium qui sert à décaper la membrane des levures puis elles subissent un choc thermique. Cette méthode s'applique à de petits plasmides circulaires réplicatifs et à des fragments linéaires intégratifs. Les souches de *S.cerevisiae* sont repiquées la veille à partir d'une colonie isolée sur un milieu YPAD agar (0.0075% (p/v) de sels de l-Adénine hémisulfate, 1% (p/v)

d'extrait de levure, 2% (p/v) de Bacto[®]peptone, 2% (p/v) de dextrose, 2% (p/v) de Bacto[®]agar dans 10 mL de milieu YPAD liquide (sans agar) et mis en culture sous agitation la nuit à 28°C. Le matin on inocule au 1/20^{ème} les souches dans 50 mL de milieu YPAD et mises en culture sous agitation à 28°C jusqu'à obtenir une DO₆₀₀ de 1.0. Les cellules sont centrifugées à 1000 g pendant 5 minutes à température ambiante. Le culot est resuspendu doucement dans 10 mL de tampon LTE (0.1M LiOAc, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA). Les cellules sont centrifugées à 1000 g pendant 5 minutes, le culot est repris dans 0.5 mL de tampon LTE. Les levures devenues compétentes sont conservées à 4°C jusqu'à leur utilisation (3 jours max.).

4. Transformation des levures

La transformation des levures est réalisée avec 50 µL de levures compétentes et 1 à 3 µg de chaque plasmide pESC à intégrer. On ajoute 300 µL de mix de transformation (40% (p/v) de polyéthylèneglycol 3350 (PEG3350), 0.1 M LiOAc, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA). Le mélange est incubé à 30°C pendant 30 minutes puis à 42°C pendant 15 minutes. On lave les cellules 3 fois à l'eau distillée pour éliminer tout le PEG. On reconcentre les levures dans 100 µL d'eau distillée par centrifugation 4 minutes à 1000 g et on étale sur des boites de SD agar (0.67% (p/v) de YNB (Yeast nitrogen base ; sans acide aminé et sans source d'azote), 0.5% (p/v) de (NH₄)₂SO₄, 2% (p/v) de dextrose, 2% (p/v) de Bacto[®]agar, 1.3g de mélange d'acides aminés), Ce milieu peut être supplémenté en acides aminés correspondants aux auxotrophies de sélection des vecteurs pESC aux concentrations finales suivante : L-histidine à 20 mg/L, L-leucine à 60 mg/L, L-tryptophane à 40 mg/L ou L-Uracile à 20 mg/L. On incube à 30°C pendant 2-3 jours.

Le mélange d'acides aminés est utilisé aux concentrations finales suivantes : Adénine sulfate à 40 mg/L, L-arginine à 20 mg/L, L-acide aspartique à 100 mg/L, L-acide glutamique à 100 mg/L, L-lysine à 30 mg/L, L-phénylalanine à 50 mg/L, L-sérine à 375 mg/L, L-thréonine à 200 mg/L, L-tyrosine à 30 mg/L et L-valine à 150 mg/L. La L-méthionine est volontairement supprimée du mélange pour permettre à la voie de biosynthèse de la méthionine d'être activée et de produire un pool de PAPS.

4. Screening des souches par PCR sur colonie

Malgré la sélection des souches par résistance antibiotique, une sélection des clones positifs est réalisée par PCR sur colonie directement à partir des colonies obtenues sur boîte avec des brins d'amorces designés spécifiquement.

II. Culture à haute densité

1. Paramètres de culture

Les cultures de 1 L à haute densité sont effectuées dans des fermenteurs SGI de 2 L avec un volume initial de milieu de 1 L (Samain, 1997). Le milieu de culture est inoculé avec 20 mL de préculture de la nuit ou de la journée. Les cultures de 200 mL à haute densité sont effectuées dans des fermenteurs BioFors de 500 mL avec un volume initial de 200 mL. Le milieu de culture est inoculé avec 5 mL de préculture de bactéries de la nuit ou 6 mL de préculture de levure de la journée. Les accepteurs (lactose, lactoside d'allyle, galactose, galactoside de propargyle selon le cas) sont ajoutés au début des phases d'alimentation, en même temps que l'inducteur (IPTG à 50 mg/L pour les bactéries ou galactose à 2 g/L pour les levures). Le milieu d'alimentation est introduit à 2.4 mL/h durant les 3 heures de la phase d'adaptation au glycérol puis à 1.5 mL/h durant la phase de production. La température est maintenue à 34°C pendant la phase d'accroissement de la biomasse, puis baissée à 28°C pour la phase de production pour les bactéries, et maintenue à 28°C pour les cultures de levure. Le pH est ajusté à 6.8 avec du NH₃ 28% pour les bactéries, et régulé à 4.7 avec du NH₃ 28% dilué 4x et du H₂SO₄ conc dilué 5x pour les levures. Le pourcentage d'oxygène disponible dans le milieu est gardé supérieur à 25% grâce notamment à la régulation de l'agitation, entre 200 et 1200 rpm pour les bactéries et entre 150 et 600 rpm pour les levures.

2. Composition des milieux de culture

Le milieu de culture pour la fermentation de cellules d'*E.coli* est composé de NH₄H₂PO₄ (7 g/L), de KH₂PO₄ (7 g/L), d'acide citrique (0.5 g/L), de KOH (0.5 g/L), de NaOH (2.5 g/L), de la solution des traces minérales (7.5 mL/L). Le MgSO₄ (1 g/L), le glucose (17.5 g/L), la thiamine (4.5 mg /L) et les antibiotiques (0.1%) sont ajoutés dans le milieu au moment de l'inoculation. La solution d'alimentation standard renferme du glycérol (500 g/L) ou du glucose (500 g/L) comme source d'énergie et de carbone, du MgSO₄ (12 g/L) et de la solution des traces minérales (25 mL/L). Cette dernière contient du nitrilotriacétate (70 mM, pH 6.5), du citrate ferrique (7,5 g/L), du MnCl₂. 4H₂O (1,3 g/L), du CoCl₂. 6H₂O (0,21 g/L), du CuCl₂. 2H₂O (0,13 g/L), du H₃BO₃ (0,25 g/L), du ZnSO₄. 7H₂O (1,2 g/L) et du Na₂MoO₄.2H₂O (0,15 g/L).

Le milieu de culture pour la fermentation de cellules de *S.cerevisiae* est composé de 0.67% (p/v) de YNB (Yeast nitrogen base ; sans acide aminé et sans source d'azote), de 0.5% (p/v) de (NH₄)₂SO₄, de 2% (p/v) de dextrose, et de 1.3g de mélange d'acides aminés, complété en fonction des vecteurs utilisés : Tryptophane 200 mg/L, Uracile 100 mg/L, Leucine 300 mg/L, Histidine 100 mg/L.. Lors des phases d'alimentation, la solution d'alimentation est composée de YNB sans acide aminé et sans ammoniacque (37 g/l), de (NH₄)₂SO₄ (28 g/L), du mélange d'acide aminé (7 g/L), et éventuellement des acides aminés liés aux auxotrophies appropriés. Du galactose, utilisé comme

source de carbone et d'énergie et comme inducteur des promoteurs GAL1 et GAL10, suivant les cultures peut être ajouté également dans l'alimentation (0.750 g/L/h) pour éviter un choc osmotique en cas d'ajout direct en début de phase de production et une compétitivité avec le lactose sur la lactose perméase.

3. Suivi de la culture

Des prélèvements de 1 mL sont réalisés à différents temps pendant la culture. Ils sont centrifugés pendant 2 minutes à 13000 rpm pour séparer la fraction extracellulaire du culot bactérien. Ce dernier est resuspendu dans 1 mL d'eau distillée, porté à ébullition pendant 20 minutes pour lyser les cellules et centrifugé une nouvelle fois pendant 2 minutes à 13000 rpm. Le nouveau surnageant contient les oligosaccharides du milieu intracellulaire.

4. Analyse des prélèvements par chromatographie sur couche mince

L'avancement des fermentations et réactions a été suivi par chromatographie sur couche mince (CCM) sur des plaques de silice (TLC Gel de silice 60 F254 de Merck, Darmstadt) en utilisant des systèmes d'éluants appropriés. La migration des échantillons est effectuée en cuve fermée en saturation du solvant de migration. Pour une migration lente des échantillons un mélange n-Butanol/AcOH/H₂O en proportion 2/1/1 est utilisé, alors que pour une migration plus rapide un mélange AcOH/n-Butanol/EtOH/Pyridine/H₂O en proportion 1/10/100/10/30 est utilisé. La révélation est effectuée par trempage des plaques dans des révélateurs spécifiques, un mélange acide (H₂SO₄-MeOH-H₂O : 3/45/45) pour les composés protégés ou un mélange acide à base d'orcinol (1g/L dans H₂SO₄/EtOH/H₂O 3:70:20) pour les composés libres, puis chauffage à 300°C.

III. Purification des oligosaccharides

1. Extraction par adsorption sur charbon actif

A la fin de la fermentation, la culture est centrifugée pendant 25 minutes à 7000 g. Après séparation du surnageant, le culot est resuspendu dans un volume de l'eau équivalent. Les cellules sont lysées par autoclavage (50 min à 100°C). Les débris cellulaires et les protéines bactériennes sont éliminés puis, la solution est filtrée par adsorption sur un mélange composé de 50 g de célite (Diatomaceous earth non washed, SiO₂ 90%, D5590, Sigma) et 50 g de charbon végétal actif (Activated charcoal, C5510, Sigma). Après trois lavages avec 1 L d'eau chacun, les oligosaccharides sont élués avec une solution d'éthanol 50%. Après évaporation sous vide du mélange éthanol-eau, le produit brut de la fermentation est lyophilisé.

2. Purification par chromatographie d'exclusion

L'extrait brut est purifié par chromatographie d'exclusion à l'aide d'une colonne Toyopearl HW40S (4.5 × 95 cm) éluée au NaHCO₃ 0.1M à un flux de 3 mL/min à 50°C ou à l'aide d'un appareil de GPC muni d'une colonne de HW40 (1.5 x 100 cm) éluée à l'eau distillée à un débit de 0.4 mL/min. La détection est réalisée par réfractométrie.

3. Purification par chromatographie échangeuse d'ions

Les oligosaccharides glucuronylés ou sulfatés, chargés négativement, sont séparés des oligosaccharides neutres par fixation sur une résine Dowex 1x4 sous forme HCO₃⁻ (5 cm × 30 cm). La résine est lavée à l'eau distillée, puis les oligosaccharides chargés sont élués avec un gradient linéaire de NaHCO₃ de 0 à 1M à un débit de 6 mL/min. Le bicarbonate de sodium est ensuite éliminé avec une résine Amberlite IR120 H⁺. Les différentes fractions recueillies sont ensuite déposées sur CCM pour regrouper celles qui contiennent le même oligosaccharide.

Une purification des oligosaccharides chargés est réalisée par fixation des oligosaccharides sur une résine DEAE A25 (AcO⁻) (5 x 30 cm). Après lavage à l'eau distillée, les oligosaccharides chargés sont élués avec un gradient de AcONa 0-1M à un débit de 6 mL/min. Les différentes fractions recueillies sont ensuite déposées sur CCM pour regrouper celles qui contiennent le même oligosaccharide.

4. Purification par chromatographie flash

Les séparations par chromatographie rapide sont réalisées sous pression d'air comprimé sur colonne de gel de silice (Merck Geduran SI 60 ;40-63µm) avec l'éluant indiqué.

IV. Caractérisation des oligosaccharides

1. Analyse par spectrométrie de masse

Les spectres de masse sont obtenus par la méthode en électrospray négatif et positif (ESI). Les échantillons sont passés sur le spectromètre quadripôle ZQ™ Micromass version 2000uma de Waters. L'oligosaccharide en solution aqueuse à une concentration de 0.05 mg/mL est injecté dans le capillaire à une vitesse de 0.4 µL/min. Les paramètres de la source d'ionisation sont les suivants :

- voltage du champ électrique : 3.51kV
- température de la source : 100°C
- voltage du cône : 80V

Les spectres de masse haute résolution ESI sur réalisés sur un spectrophotomètre ZQ 4000 Waters-Micromass au Laboratoire des Glucides d'Amiens en France.

Les spectres RMN sont réalisés au CERMAV sur un appareil Bruker AC 300 ou sur un appareil Bruker Avance 400 à 298 K et. Les spectres RMN ¹H et ¹³C sont réalisés dans D₂O.

Les pouvoirs rotatoires des composés purs sont mesurés à une température de 20°C à concentrations connues avec un polarimètre Perkin-Elmer 341, utilisant une lampe à sodium ($\lambda = 589$ nm).

2. Spectres RMN

Les spectres RMN ¹³C et ¹H sont réalisés à partir d'une solution de 20 mg de produit pur lyophilisé et dissous dans 500 mL d'oxyde de deutérium (D₂O). Les spectres ¹³C sont obtenus à l'aide du spectromètre AC300 BRUKER (300 MHz) muni d'un champ magnétique de 7.05 Tesla. Les spectres ¹H des oligosaccharides de petites tailles (2 à 4 unités saccharidiques) sont effectués sur le même appareil. Seule la température d'acquisition est variable entre 298 et 338 K. Pour les plus grands oligosaccharides (> 4 unités saccharidiques), les spectres ¹H sont réalisés avec le spectromètre BRUKER AVANCE 400 doté d'un aimant supraconducteur plus puissant de 9.4 Tesla à blindage actif. Les déplacements chimiques (δ) sont donnés à 298 K en ppm relatifs aux pics résiduels du solvant (CHCl₃ : ¹H δ 7.24; ¹³C δ 77.0 pic central; HOD ¹H 4.8) comme référence interne pour les composés protégés.

V. Test Enzyme-Linked Lectin Assay (ELLA)

Le protocole a été adapté du test ELISA de Patricia L. Clark et *al.*, il comprend 4 étapes :

1ère étape : les néoglycoprotéines (100 μ L de chaque solution) présentant l'antigène HNK-1 ou HNK-1 atypique à leur surface sont déposées au fond des puits d'une plaque de microtitration (PS-PLAQUE 96 puits à fixation moyenne, GREINER) pendant deux heures à 37°C. Les puits sont ensuite vidés et saturés avec 150 μ L de tampon de blocage (1% sérum albumine bovine (p/v, BSA) dans PBS 1X) pendant une heure à T°C amb. Des puits témoins sont réalisés avec la protéine BSA qui ne possède aucun motif oligosaccharidique à sa surface.

2ème étape : après lavage avec 200 μ L de tampon de lavage (0.05% Tween 20 (p/v), PBS 1X), 100 μ L de chacun des différents anticorps primaires anti-HNK1 sont mis en solution et incubés à 37°C pendant 1 heure. Les puits de plaque de microtitration sont lavés quatre fois avec 200 μ L de tampon de lavage pour éliminer les anticorps qui ne se sont pas fixés à la surface des glycoprotéines immobilisées.

3ème étape : 100 μ L de la solution contenant les différents anticorps secondaires liés à la peroxydase sont ajoutés dans chaque puits, l'interaction est laissée 1 heure à température ambiante. Les puits de

plaque de microtitration sont lavés quatre fois avec 200 μL de tampon de lavage. La révélation se fait par ajout de 100 μL du réactif OPD (O-phenylènediamine, Sigma Fast™ OPD) et la coloration est laissée à développer à l'obscurité. La réaction HRGP est arrêtée par 50 μL d'acide sulfurique (1M) dès que la coloration bleue apparaît et l'absorbance est mesurée à 490nm. Les résultats présentés tiennent compte des puits blancs (sans protéine).

VI. Dosages

1. Dosage des acides uroniques

La teneur en acide uronique est quantifiée par le dosage avec le 3-hydroxydiphényle (N. Blumenkranzt) avec l'acide glucuronique comme standard. A 200 μL d'une solution à doser contenant 0.5 à 20 μg d'acide uronique, dans la glace on ajoute 1.2 mL de réactif A (0.0125 M tétraborate de sodium dans H_2SO_4). Après hydrolyse pendant 10 minutes à 100°C, 20 μL de réactif C (0.15% de 3-hydroxydiphényle (p/v) dans le réactif B (0.5% NaOH dans l'eau)) sont ajoutés. Après agitation, la solution est laissée à colorer à l'obscurité. L'absorbance est lue à 520 nm contre un blanc ne contenant pas de MHDP.

2. Dosage des protéines

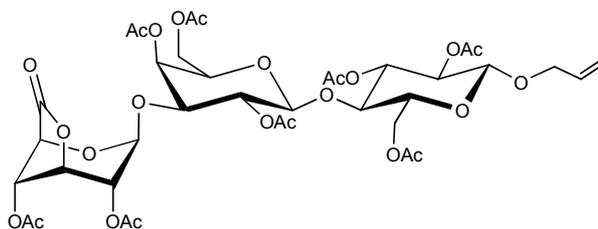
La teneur en protéines est quantifiée par le dosage des protéines de Bradford avec un standard BSA. 200 μL de colorant Biorad sont ajoutés à 800 μL de solution à doser dans l'eau, la solution est laissée à température ambiante. L'absorbance est lue à 595 nm.

3. Dosage des sucres totaux

La teneur en sucre total est quantifiée par le dosage au phénol-acide sulfurique (Dubois, 1956). A 200 μL de la solution à doser, sont ajoutés 200 μL de phénol 5% dans l'eau et 1 mL d'acide sulfurique dans la glace. Après agitation, le mélange est laissé à température ambiante à l'obscurité pendant 30 min. L'absorbance est lue à 490 nm contre un blanc. Le standard utilisé pour la courbe est de l'acide glucuronique.

VII. Sulfatation chimique

[(2,4-di-*O*-acétyl-β-D-glucopyranosylurono-6,3-lactone)-(1-3)]-(2,4,6-tri-*O*-acétyl-β-D-galactopyranosyl)-(1,4)-2,3,6-tri-*O*-acétyl-β-D-glucopyranoside d'allyle (**1**).



Chemical Formula: C₃₇H₄₈O₂₄

Une suspension de composé de GlcA-Lac-Allyle (84 mg, 145 μmol) dans Ac₂O (3 mL) est chauffée à 80°C pendant 4 h, et ensuite refroidit à température ambiante. On ajoute de la pyridine (3 mL) en mélange avec une quantité catalytique de DMAP (6 mg). Après 24 h le mélange est co-évaporé avec une pompe palette avec du toluène (2x 5 mL) à 30°C. Après purification par chromatographie rapide sur gel de silice (acétate d'éthyle/éther de pétrole : 7-3), le composé **1** est obtenu (69 mg, 78.7 μmol, 54%).

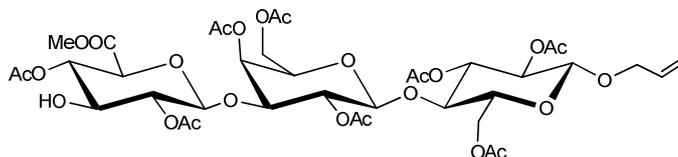
[α]_D²⁰ -26.1 (*c* 0.7, CHCl₃)

¹H RMN (CDCl₃) δ 5.80 (m, 1H, OCH₂CH=CH₂); 5.34 (d, 1H, *J* 3 Hz, H-4^{Gal}); 5.22 (dd, 1H, *J* 1, 17 Hz, OCH₂CH=CH₂); 5.17-5.03 (m, 3H, OCH₂CH=CH₂, H-3^{Glc}, H-2^{Gal}); 4.96-4.83 (m, 5H, H-2^{Glc}, H-1^{GlcA}, H-2^{GlcA}, H-3^{GlcA}, H-4^{GlcA}); 4.48 (d, *J* 7.8 Hz, H-1^{Glc}); 4.42 (dd, 1H, *J* 2, 12 Hz, H-6a^{Glc}); 4.32 (d, *J* 7.8 Hz, H-1^{Gal}); 4.26 (dd, 1H, *J* 4.8, 13 Hz, OCH₂C=CH₂); 4.10-4.0 (m, 3H, OCH₂C=CH₂, H-6b^{Glc}, H-6a^{Gal}); 3.92 (dd, *J* 7, 11.5 Hz, H-6b^{Gal}); 3.76-3.69 (m, 3H, H-3^{Gal}, H-4^{Glc}, H-5^{Gal}); 3.56 (m, 1H, H-5^{Glc}); 2.16-1.95 (m, 24H, OCOCH₃)

¹³C RMN (CDCl₃) δ 170.5-168.1; 133.3; 117.6; 101.5; 100.8; 99.3; 79.0; 75.7; 72.7; 72.4; 71.8; 71.5; 70.9; 70.5; 70.0; 69.3; 68.2; 67.9; 67.2; 62.2; 62.1; 20.9-20.4

HRMS (MALDI-TOF) Calcd pour C₃₇H₄₈O₂₄ [M+K]⁺: 915.... Trouvé

[(methyl 2,4-di-*O*-acétyl-β-D-glucopyranosyluronoate)-(1-3)]-(2,4,6-tri-*O*-acétyl-β-D-galactopyranosyl)-(1,4)-2,3,6-tri-*O*-acétyl-β-D-glucopyranoside d'allyle (**2**).



Chemical Formula: C₃₈H₅₂O₂₅

Une solution de la lactone **1** (61 mg, 70 μ mol) est traitée avec AcONa anhydre (6 mg, 1 équiv.) dans MeOH anhydre (3 mL) à température ambiante. Après disparition du produit de départ suivi en CCM (2 h), on neutralise la réaction avec une résine Amberlite IR 120 (forme H⁺). La résine est filtrée et le filtrat est évaporé à sec. Le composé **2** (52 mg, 57 μ mol) est obtenu après chromatographie flash (7 :3 acétate d'éthyle/éther de pétrole) avec un rendement de 82 %, sous forme de poudre blanche.

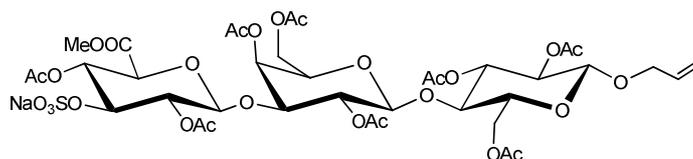
$[\alpha]_D^{20}$ -13.2 (*c* 1.6, CHCl₃)

¹H RMN (CDCl₃) δ 5.80 (m, 1H, OCH₂CH=CH₂); 5.34 (d, 1H, *J* 3 Hz, H-4^{Gal}); 5.22 (dd, 1H, *J* 1, 17 Hz, OCH=CH₂); 5.20-5.03 (m, 4H, H-3^{Glc}, H-2^{Gal}, H-4^{GlcA}, OCH=CH₂); 4.89 (t, 1H, *J* 9 Hz, H-2^{Glc}); 4.75 (t, 1H, *J* 9 Hz, H-2^{GlcA}); 4.52 (d, 1H, *J* 7.5 Hz, H-1^{GlcA}); 4.48 (d, 1H, *J* 7.8 Hz, H-1^{Glc}); 4.41 (dd, 1H, *J* 1.5, 12 Hz, H-6a^{Glc}); 4.30 (d, 1H, *J* 8 Hz, H-1^{Gal}); 4.26 (dd, 1H, *J* 5, 13 Hz, OCH₂CH=CH₂); 4.10-3.95 (m, 3H, OCH₂CH=CH₂, H-6b^{Glc}, H-6a^{Gal}); 3.89 (d, *J* 10 Hz, H-5^{GlcA}); 3.81-3.69 (m, 6H, COOCH₃, H-3^{Gal}, H-4^{Glc}, H-5^{Gal}); 3.64 (t, 1H, *J* 9 Hz, H-3^{GlcA}); 3.55 (m, 1H, H-5^{Glc}); 2.10-1.98 (m, 24H, OCOCH₃)

¹³C RMN (CDCl₃) δ 170.5-167.1; 133.3; 117.6; 100.7; 100.4; 99.3; 76.0; 75.9; 73.2; 72.9; 72.7; 72.6; 71.7; 71.5; 71.2; 70.9; 70.0; 68.5; 62.1; 61.6; 52.8; 20.8-20.5

HRMS (MALDI-TOF) Calcd pour C₃₈H₅₂O₂₅ [M+Na]⁺: Trouvé

[(méthyl 2,4-di-*O*-acétyl-3-*O*-sulfo- β -D-glucopyranosyluronate)-(1-3)]-(2,4,6-tri-*O*-acétyl- β -D-galactopyranosyl)-(1-4)-2,3,6-tri-*O*-acétyl- β -D-glucopyranoside d'allyle, sels de sodium (4**).**



Chemical Formula: C₃₈H₅₁NaO₂₈S

Une solution de **2** (42 mg, 46.2 μ mol) dans du DMF (1 mL) est traitée avec un complexe de SO₃.Py (68 mg) pendant la nuit à température ambiante. On neutralise la réaction avec du bicarbonate de sodium (80 mg) et on agite pendant 1h. Le solide est filtré sur fritté et lavé avec du méthanol (10 mL), et le filtrat est traité avec une résine échangeuse de cation IR120 (forme Na⁺) pendant 20 min. La résine est filtrée avec un fritté et lavée avec du méthanol (10 mL). Le filtrat est évaporé à sec et purifié par chromatographie flash sur colonne de gel de silice (dichlorométhane/méthanol : 9-1) pour donner le composé **3** (30 mg, 29.7 μ mol) avec un rendement de 64%.

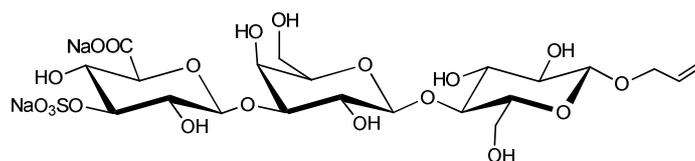
$[\alpha]_D^{20} -4.7$ (*c* 1.1, H₂O)

¹H RMN (CDCl₃) δ 5.81 (m, 1H, OCH₂CH=CH₂); 5.37 (d, *J* 3 Hz, H-4^{Gal}); 5.30 – 5.15 (m, 4H, OCH=CH₂, H-3^{Glc}, H-4^{GlcA}); 4.99 (t, 1H, *J* 9 Hz, H-2^{Gal}); 4.89 (m, 2H, H-2^{Glc}, H-2^{GlcA}); 4.68 (d, 1H, *J* 8 Hz, H-1^{GlcA}); 4.56 – 4.42 (m, 3H, H-1^{Glc}, H-3^{GlcA}, H-6a^{Glc}); 4.37 (d, 1H, *J* 8 Hz, H-1^{Gal}); 4.27 (dd, 1H, *J* = 13, 5 Hz, 1H, OCH₂CH=CH₂), 4.13 – 3.80 (m, 7H, OCH₂CH=CH₂, H-3^{Gal}, H-5^{Gal}, H-5^{Glc}, H-6b^{Glc}, H-6a,b^{Gal}), 3.76-3.68 (m, 4H, COOCH₃, H-4^{Glc}); 3.58 (m, 1H, H-5^{Glc}); 2.14 – 1.94 (m, 27H, OCOCH₃),

¹³C RMN (CDCl₃) δ 171.8-168.1; 133.3; 117.5; 100.5; 100.3; 99.3; 77.7; 77.2; 75.9; 72.7; 72.6; 72.2; 71.6; 71.4; 71.1; 70.7; 69.9; 69.5; 68.9; 62.1; 62.0; 53.2; 20.8-20.6

HRMS (MALDI-TOF) Calcd pour C₃₈H₅₂O₂₈S [M+Na]⁺: Trouvé

[(3-*O*-sulfo-β-D-acide glucopyranosyluronique)-(1-3)]-(β-D-galactopyranosyl)-(1-4)-β-D-glucopyranoside d'allyle, sels di-sodium (4**).**



Chemical Formula: C₂₁H₃₂Na₂O₂₀S

Une solution aqueuse de LiOH 2M (0.1 mL) est ajoutée à une solution de **3** (30 mg, 29.7 μmol) dans un mélange THF-eau 10 :1 (3.3 mL) à 0°C. Le mélange est laissé en retour à température ambiante pendant 2h, et il est neutralisé avec AcOH, concentré et lyophilisé. A une solution du résidu dissout dans MeOH (0.75 mL) et de l'eau (0.25 mL), du MeONa 1M (0.325 mL) est ajouté. Le mélange est laissé à température ambiante durant 48h, puis neutralisé avec de l'acide acétique, concentré et lyophilisé. Le résidu est dessalé sur une colonne Toyo Pearl HW-40 S dans de l'eau (1000x1 cm) pour donner le produit **4** (12 mg, 13.7 μmol).

$[\alpha]_D^{20} -13.6$ (*c* 0.5, H₂O)

¹H RMN (CDCl₃): 5.87 (m, 1H, OCH₂CH=CH₂); 5.27 (dd, 1H, *J* 1.5, 17 Hz, OCH=CH₂); 5.17 (dd, 1H, *J* 1.5, 10 Hz, OCH=CH₂); 4.65 (d, 1H, *J* 8 Hz); 4.42 (d, 1H, *J* 8 Hz); 4.39 (d, 1H, *J* 8 Hz); 4.28 (dd, 1H, *J* 6, 12.5 Hz); 4.23 (t, 1H, *J* 9 Hz); 4.11 (dd, 1H, *J* 6, 12.5 Hz); 4.06 (d, 1H, *J* 3Hz); 3.87 (dd, 1H, *J* 2, 12 Hz); 3.73-3.46 (m, 12H); 3.22 (t, 1H, *J* 8.5 Hz)

¹³C RMN (CDCl₃): δ176.2 ; 134.0 ; 119.5 ; 103.9 ; 103.2 ; 101.7 ; 84.2 ; 83.0 ; 78.9 ; 76.6 ; 75.7 ; 75.4 ; 75.1 ; 73.5 ; 72.6 ; 71.4 ; 71.2 ; 70.8 ; 68.8 ; 61.7 ; 60.8

HRMS (MALDI-TOF) Calcd pour C₂₁H₃₄O₂₀S

VIII. Conjugaison des oligosaccharides avec la sérum albumin bovine

Une solution de **4** (34 mg, 50.3 μ mol) dans MeOH (5 mL) est agité à -50°C sous un flux d'ozone (0.25 g/h, 0.4 bar O₂, 160 V) généré par un ozoneur Kaufmann Umwelttechnik OZ1-L. Le mélange est laissé 1 heure (suivi par CCM de la disparition complète du produit de départ). Le ballon est purgé deux fois à -50°C avec de l'argon et un excès de sulfide diméthyle est ajouté (33 mg, 40 μ l, 10 équiv.). Le mélange est laissé trois heures avec un retour progressif à température ambiante puis concentré. L'aldéhyde brut **7** est dissout dans de l'eau distillée (1 mL), puis est ajouté une solution de BSA (12.8 mg dans 400 μ l d'eau) et de sodium cyanoborohydrure (25 mg dans 200 μ l d'eau). Le mélange est agité 72h à 37°C. Après dialyse contre de l'eau (Visking typ 20/32 MWCO 14 000) et lyophilisation, on obtient le produit **5**.

Une solution de GlcA-Lc-Allyle (50 mg, 50.3 μ mol) dans MeOH (5 mL) est agité à -50°C sous un flux d'ozone (0.25 g/h, 0.4 bar O₂, 160 V) généré par un ozoneur Kaufmann Umwelttechnik OZ1-L. Le mélange est laissé 1 heure (suivi par CCM de la disparition complète du produit de départ). Le ballon est purgé deux fois à -50°C avec de l'argon et un excès de sulfide diméthyle est ajouté (55.6 mg, 66 μ l, 20 équiv.). Le mélange est laissé trois heures avec un retour progressif à température ambiante puis concentré. L'aldéhyde brut **8** est dissout dans de l'eau distillée (1 mL), puis est ajouté une solution de BSA (20 mg dans 400 μ l d'eau) et de sodium cyanoborohydrure (51 mg dans 200 μ l d'eau). Le mélange est agité 72h à 37°C. Après dialyse contre de l'eau (Visking typ 20/32 MWCO 14 000) et lyophilisation, on obtient le produit **6**.

IX. Gel d'électrophorèse et westernblot

Les protéines ont été produites et purifiées comme suit :

Un ensemencement d'une culture de la nuit au 1/100 est réalisé dans 250mL de LB, puis la culture incube à 28°C. L'induction est réalisée sur la nuit par l'IPTG à partir d'une DO600 de 0,6. Après centrifugation (20', 8000g), les bactéries sont reprises dans 4 mL de tampon de lyse (Tris pH 8, NaCl 0.5M) et cassées au disrupteur. Après une ultracentrifugation (30' à 50000g), le tampon de dénaturation (x6) et du β -mercaptoéthanol (10% vol/vol) sont ajoutés immédiatement (fraction soluble : + 1/6 vol de tampon de dénaturation x6 ; fraction insoluble : reprise dans tp de lyse (même volume que surnageant), puis ajout du tampon de dénaturation). Après chauffage 5 min à 100°C, 20 μ l de chaque fraction sont déposés sur le gel de polyacrylamide (gel de séparation [Tris-HCl (1.5M, pH 8.8) 25% (v/v), solution d'acrylamide (30%)/ bis acrylamide (0.8%) 33% (v/v), SDS (10%) 1% (v/v), TEMED (N,N,N',N'-Tétraméthyléthyléthylenediamine) 0.04% (v/v), persulfate d'ammonium (10%) 1% (v/v)] et de concentration [Tris-HCl (1M, pH 6.8) 13% (v/v), solution d'acrylamide (30%)/ bis

acrylamide (0.8%) 17% (v/v), SDS (10%) 1% (v/v), TEMED 0.1% (v/v), persulfate d'ammonium (10%) 1% (v/v)].

L'électrophorèse est réalisée avec du tampon de migration [Tris 25 mM, pH 8.5, glycine 192 mM, SDS 0.1%] à 30 mA constant pendant une heure.

La coloration du gel s'effectue par la solution de coloration au bleu de Coomassie [Coomassie R250 : 0.25% (p/v), acide acétique 9% (v/v), éthanol 45% (v/v)]. L'excès de colorant est éliminé par plusieurs bains dans la solution de décoloration [acide acétique 7.5%(v/v), éthanol 5% (v/v)].

BIBLIOGRAPHIE

A

- Abo, T. & Balch, C.M. A differentiation antigen of human NK and K cells identified by a monoclonal antibody (HNK-1). *J. Immunol* 127, 1024-1029 (1981).
- Allory, Y., Matsuoka, Y., Bazille, C., Christensen, E. I.; Ronco, P. & Debiec, H. The L1 cell adhesion molecule is induced in renal cancer cells and correlates with metastasis in clear cell carcinomas. *Clin. Cancer Res* 11, 1190-1197 (2005).
- Andrianopoulos, K., Wang, L. & Reeves, P.R. Identification of the fucose synthetase gene in the colanic acid gene cluster of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol* 180, 998-1001 (1998).
- Antoine, T., Bosso, C., Heyraud, A. & Samain, E. Large scale in vivo synthesis of globotriose and globotetraose by high cell density culture of metabolically engineered *Escherichia coli*. *Biochimie* 87, 197-203 (2005).
- Asakura, K., Miller, D.J., Pease, L.R. & Rodriguez, M. Targeting of IgMkappa antibodies to oligodendrocytes promotes CNS remyelination. *J. Neurosci* 18, 7700-7708 (1998).

B

- Baenziger, J.U., Kumar, S., Brodbeck, R.M., Smith, P.L. & Beranek, M.C. Circulatory half-life but not interaction with the lutropin/chorionic gonadotropin receptor is modulated by sulfation of bovine lutropin oligosaccharides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 89, 334-338 (1992).
- Bakker, H., Schachner, M., friedmann, I., Oka, S., Kawasaki, T., Nifant'ev, N. & Mantei, N. Expression Cloning of a cDNA Encoding a Sulfotransferase Involved in the Biosynthesis of the HNK-1 Carbohydrate Epitope. *Journal of Biological Chemistry* 272, 29942-29946 (1997).
- Bastide, L., Priem, B. & Fort, S. Chemo-bacterial synthesis and immunoreactivity of a brain HNK-1 analogue. DOI: 10.1016/j.carres.2010.11.028 (2010).
- Baumann, N. Specificity of antiglycolipid antibodies. *Clin Rev Allergy Immunol* 19, 31-40 (2000).
- Benov, L., Kredich, N.M. & Fridovich, I. The mechanism of the auxotrophy for sulfur-containing amino acids imposed upon *Escherichia coli* by superoxide. *J. Biol. Chem* 271, 21037-21040 (1996).
- Ben-Zaken, O., Tzaban, S., Tal, Y.; Horonchik, L., Esko, J. D., Vlodaysky, I. & Taraboulos, A. Cellular heparan sulfate participates in the metabolism of prions. *J. Biol. Chem* 278, 40041-40049 (2003).
- Blanchard, R.L., Freimuth, R.R., Buck, J., Weinshilboum, R.M. & Coughtrie, M.W.H. A proposed nomenclature system for the cytosolic sulfotransferase (SULT) superfamily. *Pharmacogenetics* 14, 199-211 (2004).

- Blanchard, S., Turecek, F. & Gelb, M.H. Short synthetic sequence for 2-sulfation of alpha-L-iduronate glycosides. *Carbohydr. Res* 344, 1032-1033 (2009).
- Bistrup, A.; Bhakta, S.; Lee, J. K.; Belov, Y. Y.; Gunn, M. D.; Zuo, F. R.; Huang, C. C.; Kannagi, R.; Rosen, S. D. & Hemmerich, S. Sulfotransferases of two specificities function in the reconstitution of high endothelial cell ligands for L-selectin. *J. Cell Biol* 145, 899-910 (1999).
- Bowman, K.G., Cook, B.N., de Graffenried, C.L. & Bertozzi, C.R. Biosynthesis of L-selectin ligands: sulfation of sialyl Lewis x-related oligosaccharides by a family of GlcNAc-6-sulfotransferases. *Biochemistry* 40, 5382-5391 (2001).
- Brion, F., Schwartz, J.C. & Vargas, F. Properties and localization of the sulfate-activating system in rat brain. *J. Neurochem* 48, 1171-1177 (1987).
- Bronner-Fraser, M. Analysis of the early stages of trunk neural crest migration in avian embryos using monoclonal antibody HNK-1. *Dev. Biol* 115, 44-55 (1986).
- Bullock, S.L., Fletcher, J.M., Beddington, R.S. & Wilson, V.A. Renal agenesis in mice homozygous for a gene trap mutation in the gene encoding heparan sulfate 2-sulfotransferase. *Genes Dev* 12, 1894-1906 (1998).
- Burkart, M.D., Izumi, M. & Wong, C.H. Enzymatic Regeneration of 3'-Phosphoadenosine-5'-Phosphosulfate Using Aryl Sulfotransferase for the Preparative Enzymatic Synthesis of Sulfated Carbohydrates. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl* 38, 2747-2750 (1999).
- Burkart, M.D., Izumi, M., Chapman, E., Lin, C.H. & Wong, C.H. Regeneration of PAPS for the enzymatic synthesis of sulfated oligosaccharides. *J. Org. Chem* 65, 5565-5574 (2000).
- Butcher, E.C. & Picker, L.J. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 272, 60-66 (1996).



- Casado, J. G., Delgado, E., Patsavoudi, E., Durán, E., Sanchez-Correa, B., Morgado, S., Solana, R. & Tarazona, R. Functional implications of HNK-1 expression on invasive behaviour of melanoma cells. *Tumour Biol* 29, 304-310 (2008).
- Chang, Y.D. & Dickson, R.C. Primary structure of the lactose permease gene from the yeast *Kluyveromyces lactis*. Presence of an unusual transcript structure. *J. Biol. Chem* 263, 16696-16703 (1988).
- Cherest, H., Eichler, F. & Robichon-Szulmajster, H. Genetic and regulatory aspects of methionine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol* 97, 328-336 (1969).
- Cherest, H., Nguyen, N.T. & Surdin-Kerjan, Y. Transcriptional regulation of the MET3 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 34, 269-281 (1985).
- Chou, D. K., Ilyas, A. A., Evans, J. E., Costello, C., Quarles, R. H. & Jungalwala, F. B. Structure of sulfated glucuronyl glycolipids in the nervous system reacting with HNK-1 antibody and some IgM paraproteins in neuropathy. *J. Biol. Chem* 261, 11717-11725 (1986).

- Chou, D.K., Prasadarao, N., Koul, O. & Jungalwala, F.B. Developmental expression of HNK-1-reactive antigens in rat cerebral cortex and molecular heterogeneity of sulfoglucuronylneolactotetraosylceramide in CNS versus PNS. *J. Neurochem* 57, 852-859 (1991).
- Chou, D.K. & Jungalwala, F.B. Characterization and developmental expression of a novel sulfotransferase for the biosynthesis of sulfoglucuronyl glycolipids in the nervous system. *J. Biol. Chem* 268, 330-336 (1993).
- Chou, D.K. & Jungalwala, F.B. N-Acetylglucosaminyl transferase regulates the expression of the sulfoglucuronyl glycolipids in specific cell types in cerebellum during development. *J. Biol. Chem* 271, 28868-28874 (1996).
- Cronan, G.E. & Keating, D.H. *Sinorhizobium meliloti* sulfotransferase that modifies lipopolysaccharide. *J. Bacteriol* 186, 4168-4176 (2004).



- De Graffenried, C.L. & Bertozzi, C.R. Golgi localization of carbohydrate sulfotransferases is a determinant of L-selectin ligand biosynthesis. *J. Biol. Chem* 278, 40282-40295 (2003).
- De Graffenried, C.L. & Bertozzi, C.R. The roles of enzyme localisation and complex formation in glycan assembly within the Golgi apparatus. *Curr. Opin. Cell Biol* 16, 356-363 (2004).
- Díaz-Nido, J., Wandosell, F. & Avila, J. Glycosaminoglycans and beta-amyloid, prion and tau peptides in neurodegenerative diseases. *Peptides* 23, 1323-1332 (2002).
- Duffel, M.W. Molecular specificity of aryl sulfotransferase IV (tyrosine-ester sulfotransferase) for xenobiotic substrates and inhibitors. *Chem. Biol. Interact* 92, 3-14 (1994).
- Duffel, M.W. & Jakoby, W.B. On the mechanism of aryl sulfotransferase. *J. Biol. Chem* 256, 11123-11127 (1981).
- Duffel, M.W. & Zheng, Y. Naphthaldehydes as reversible inhibitors of rat hepatic aryl sulfotransferase IV (tyrosine-ester sulfotransferase). *Drug Metab. Dispos* 21, 400-402 (1993).
- Dumon, C.; Priem, B.; Martin, S. L.; Heyraud, A.; Bosso, C. & Samain, E. In vivo fucosylation of lacto-N-neotetraose and lacto-N-neohexaose by heterologous expression of *Helicobacter pylori* alpha-1,3 fucosyltransferase in engineered *Escherichia coli*. *Glycoconj. J* 18, 465-474 (2001).
- Dumon, C., Bosso, C., Utile, J.P., Heyraud, A. & Samain, E. Production of Lewis x tetrasaccharides by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Chembiochem* 7, 359-365 (2006).
- Dykxhoorn, D.M., St Pierre, R. & Linn, T. A set of compatible tac promoter expression vectors. *Gene* 177, 133-136 (1996).

E

- Ehrhardt, D. W.; Atkinson, E. M.; Freedberg, D. I.; Sutherlin, D. P.; Armstrong, R. & Long, S. R. In vitro sulfotransferase activity of NodH, a nodulation protein of *Rhizobium meliloti* required for host-specific nodulation. *J. Bacteriol* 177, 6237-6245 (1995).
- Evans, W. S.; Sollenberger, M. J.; Booth, R. A.; Rogol, A. D.; Urban, R. J.; Carlsen, E. C.; Johnson, M. L. & Veldhuis, J. D. Contemporary aspects of discrete peak-detection algorithms. II. The paradigm of the luteinizing hormone pulse signal in women. *Endocr. Rev* 13, 81-104 (1992).

F

- Falany, C.N. Enzymology of human cytosolic sulfotransferases. *FASEB J* 11, 206-216 (1997).
- Farooqui, A.A. Metabolism of sulfolipids in mammalian tissues. *Adv. Lipid Res* 18, 159-202 (1981).
- Fiete, D., Srivastava, V., Hindsgaul, O. & Baenziger, J.U. A hepatic reticuloendothelial cell receptor specific for SO₄-4GalNAc beta 1,4GlcNAc beta 1,2Man alpha that mediates rapid clearance of lutropin. *Cell* 67, 1103-1110 (1991).
- Fort, S.; Birikaki, L.; Dubois, M.; Antoine, T.; Samain, E. & Driguez, H. Biosynthesis of conjugatable saccharidic moieties of GM2 and GM3 gangliosides by engineered *E. coli*. *Chem. Commun. (Camb.)* 2558-2560 (2005)
- Foster, B. A.; Thomas, S. M.; Mahr, J. A.; Renosto, F.; Patel, H. C. & Segel, I. H. Cloning and sequencing of ATP sulfurylase from *Penicillium chrysogenum*. Identification of a likely allosteric domain. *J. Biol. Chem* 269, 19777-19786 (1994).
- Fujimoto, H.; Tadano-Aritomi, K.; Tokumasu, A.; Ito, K.; Hikita, T.; Suzuki, K. & Ishizuka, I. Requirement of seminolipid in spermatogenesis revealed by UDP-galactose: Ceramide galactosyltransferase-deficient mice. *J. Biol. Chem* 275, 22623-22626 (2000).
- Funderburgh, J.L. Keratan sulfate biosynthesis. *IUBMB Life* 54, 187-194 (2002).

G

- Galtrey, C.M. & Fawcett, J.W. The role of chondroitin sulfate proteoglycans in regeneration and plasticity in the central nervous system. *Brain Res Rev* 54, 1-18 (2007).
- Gamage, N.; Barnett, A.; Hempel, N.; Duggleby, R. G.; Windmill, K. F.; Martin, J. L. & McManus, M. E. Human sulfotransferases and their role in chemical metabolism. *Toxicol. Sci* 90, 5-22 (2006).
- Gandhi, N.S. & Mancera, R.L. The structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins. *Chem Biol Drug Des* 72, 455-482 (2008).
- Gebhart, W., Schuller-Petrovic, S., Lassmann, H. & Kraft, D. [NK cells and the nervous system]. *Wien. Klin. Wochenschr* 95, 828-831 (1983).

- Girard, J.P. & Springer, T.A. High endothelial venules (HEVs): specialized endothelium for lymphocyte migration. *Immunol. Today* 16, 449-457 (1995).
- Grunwell, J.R. & Bertozzi, C.R. Carbohydrate sulfotransferases of the GalNAc/Gal/GlcNAc6ST family. *Biochemistry* 41, 13117-13126 (2002).
- Gillespie, D., Demerec, M. & Itikawa, H. Appearance of double mutants in aged cultures of *Salmonella typhimurium* cysteine-requiring strains. *Genetics* 59, 433-442 (1968).

H

- Habuchi, O.; Matsui, Y.; Kotoya, Y.; Aoyama, Y.; Yasuda, Y. & Noda, M. Purification of chondroitin 6-sulfotransferase secreted from cultured chick embryo chondrocytes. *J. Biol. Chem* 268, 21968-21974 (1993).
- Habuchi, H., Habuchi, O. & Kimata, K. Sulfation pattern in glycosaminoglycan: does it have a code? *Glycoconj. J* 21, 47-52 (2004).
- Hall, H., Liu, L., Schachner, M. & Schmitz, B. The L2/HNK-1 carbohydrate mediates adhesion of neural cells to laminin. *Eur. J. Neurosci* 5, 34-42 (1993).
- Häuselmann, H. J.; Masuda, K.; Hunziker, E. B.; Neidhart, M.; Mok, S. S.; Michel, B. A. & Thonar, E. J. Adult human chondrocytes cultured in alginate form a matrix similar to native human articular cartilage. *Am. J. Physiol* 271, C742-752 (1996).
- Hayden, P.J. & Stevens, J.L. Cysteine conjugate toxicity, metabolism, and binding to macromolecules in isolated rat kidney mitochondria. *Mol. Pharmacol* 37, 468-476 (1990).
- Hemmerich, S., Bertozzi, C.R., Leffler, H. & Rosen, S.D. Identification of the sulfated monosaccharides of GlyCAM-1, an endothelial-derived ligand for L-selectin. *Biochemistry* 33, 4820-4829 (1994).
- Hemmerich, S., Butcher, E.C. & Rosen, S.D. Sulfation-dependent recognition of high endothelial venules (HEV)-ligands by L-selectin and MECA 79, and adhesion-blocking monoclonal antibody. *J. Exp. Med* 180, 2219-2226 (1994).
- Hemmerich, S. & Rosen, S.D. 6'-sulfated sialyl Lewis x is a major capping group of GlyCAM-1. *Biochemistry* 33, 4830-4835 (1994).
- Honke, K.; Tsuda, M.; Koyota, S.; Wada, Y.; Iida-Tanaka, N.; Ishizuka, I.; Nakayama, J. & Taniguchi, N. J. Molecular cloning and characterization of a human beta-Gal-3'-sulfotransferase that acts on both type 1 and type 2 (Gal beta 1-3/1-4GlcNAc-R) oligosaccharides. *J. Biol. Chem* 276, 267-274 (2001).
- Honke, K. & Taniguchi, N. Sulfotransferases and sulfated oligosaccharides. *Med Res Rev* 22, 637-654 (2002).

- Hooper, L.V., Hindsgaul, O. & Baenziger, J.U. Purification and characterization of the GalNAc-4-sulfotransferase responsible for sulfation of GalNAc beta 1,4GlcNAc-bearing oligosaccharides. *J. Biol. Chem* 270, 16327-16332 (1995).
- Hooper, L.V., Manzella, S.M. & Baenziger, J.U. From legumes to leukocytes: biological roles for sulfated carbohydrates. *FASEB J* 10, 1137-1146 (1996).
- Hounsa, C.G., Brandt, E.V., Thevelein, J., Hohmann, S. & Prior, B.A. Role of trehalose in survival of *Saccharomyces cerevisiae* under osmotic stress. *Microbiology (Reading, Engl.)* 144, 671-680 (1998).

J

- Ilg, K., Yavuz, E., Maffioli, C., Priem, B. & Aebi, M. Glycomimicry: display of the GM3 sugar epitope on *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* sv Typhimurium. *Glycobiology* 20, 1289-1297 (2010).
- Imai, Y., Singer, M.S., Fennie, C., Lasky, L.A. & Rosen, S.D. Identification of a carbohydrate-based endothelial ligand for a lymphocyte homing receptor. *J. Cell Biol* 113, 1213-1221 (1991).
- Imai, Y., Lasky, L.A. & Rosen, S.D. Sulphation requirement for GlyCAM-1, an endothelial ligand for L-selectin. *Nature* 361, 555-557 (1993).
- Ishizuka, I. Chemistry and functional distribution of sulfoglycolipids. *Prog. Lipid Res* 36, 245-319 (1997).
- Isogai, Y., Kawase, T., Ishida, H., Kiso & M., Hasegawa, A. Synthetic studies on sialoglycoconjugates 90 : total synthesis of sulfated glucuronyl paraglobosides. *J. Carbohydr. Chem.* 15, 1001-1023 (1996).
- Izawa, M.; Kumamoto, K.; Mitsuoka, C.; Kanamori, C.; Kanamori, A.; Ohmori, K.; Ishida, H.; Nakamura, S.; Kurata-Miura, K.; Sasaki, K.; Nishi, T. & Kannagi, R. Expression of sialyl 6-sulfo Lewis X is inversely correlated with conventional sialyl Lewis X expression in human colorectal cancer. *Cancer Res* 60, 1410-1416 (2000).

J

- Jennings, M.P., Hood, D.W., Peak, I.R., Virji, M. & Moxon, E.R. Molecular analysis of a locus for the biosynthesis and phase-variable expression of the lacto-N-neotetraose terminal lipopolysaccharide structure in *Neisseria meningitidis*. *Mol. Microbiol* 18, 729-740 (1995).
- Jones, L.L. & Tuszynski, M.H. Spinal cord injury elicits expression of keratan sulfate proteoglycans by macrophages, reactive microglia, and oligodendrocyte progenitors. *J. Neurosci* 22, 4611-4624 (2002).
- Jungalwala, F.B. Expression and biological functions of sulfoglucuronyl glycolipids (SGGLs) in the nervous system, A review. *Neurochem Res* 19, 945-957 (1994).

Jurascík, M.; Guimarães, P.; Klein, J.; Domingues, L.; Teixeira, J. & Markos, J. Kinetics of lactose fermentation using a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Biotechnol. Bioeng* 94, 1147-1154 (2006)

K

Kakuta, Y., Pedersen, L.G., Carter, C.W., Negishi, M. & Pedersen, L.C. Crystal structure of estrogen sulphotransferase. *Nat Struct Mol Biol* 4, 904-908 (1997).

Kakuta, Y., Sueyoshi, T., Negishi, M. & Pedersen, L.C. Crystal structure of the sulfotransferase domain of human heparan sulfate N-deacetylase/ N-sulfotransferase 1. *J. Biol. Chem* 274, 10673-10676 (1999).

Keilhauer, G., Faissner, A. & Schachner, M. Differential inhibition of neurone-neurone, neurone-astrocyte and astrocyte-astrocyte adhesion by L1, L2 and N-CAM antibodies. *Nature* 316, 728-730 (1985).

Kizuka, Y. Physical and Functional Association of Glucuronyltransferases and Sulfotransferase Involved in HNK-1 Biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry* 281, 13644-13651 (2006).

Klaassen, C.D. & Boles, J.W. Sulfation and sulfotransferases 5: the importance of 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) in the regulation of sulfation. *FASEB J* 11, 404-418 (1997).

Komatsu, K., Driscoll, W.J., Koh, Y.C. & Strott, C.A. A P-loop related motif (GxxGxxK) highly conserved in sulfotransferases is required for binding the activated sulfate donor. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 204, 1178-1185 (1994).

Kornblatt, M.J., Schachter, H. & Murray, R.K. Partial characterization of a novel glycerogalactolipid from rat testis. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 48, 1489-1494 (1972).

Kornilov, A.V., Sherman, A.A., Kononov, L.O., Shashkov, A.S. & Nifant'ev, N.E. Synthesis of 3-O-sulfoglucuronyl lacto-N-neotetraose 2-aminoethyl glycoside and biotinylated neoglycoconjugates thereof. *Carbohydr. Res* 329, 717-730 (2000).

Kovach, M.E., Elzer, P.H., Hill, S.D., Robertson, D.T., Farris, M.A., Roop II, R.M., Peterson, M. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS carrying different antibiotic-resistance cassettes, *Gene* 166, 175-176 (1995).

Kruse, J. et al. Neural cell adhesion molecules and myelin-associated glycoprotein share a common carbohydrate moiety recognized by monoclonal antibodies L2 and HNK-1. *Nature* 311, 153-155 (1984).

Kusche-Gullberg, M. & Kjellén, L. Sulfotransferases in glycosaminoglycan biosynthesis. *Curr. Opin. Struct. Biol* 13, 605-611 (2003).

L

- Läubli, H., Stevenson, J.L., Varki, A., Varki, N.M. & Borsig, L. L-selectin facilitation of metastasis involves temporal induction of Fut7-dependent ligands at sites of tumor cell arrest. *Cancer Res* 66, 1536-1542 (2006).
- Lee, S.Y. High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol* 14, 98-105 (1996).
- Leffler, H., Hansson, G.C. & Strömberg, N. A novel sulfoglycosphingolipid of mouse small intestine, IV3-sulfogangliotetraosylceramide, demonstrated by negative ion fast atom bombardment mass spectrometry. *J. Biol. Chem* 261, 1440-1444 (1986).
- Lerouge, P.; Roche, P.; Faucher, C.; Maillet, F.; Truchet, G.; Promé, J. C. & Dénarié, J. Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature* 344, 781-784 (1990).
- Leyh, T.S. The physical biochemistry and molecular genetics of sulfate activation. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol* 28, 515-542 (1993).
- Leyh, T.S., Taylor, J.C. & Markham, G.D. The sulfate activation locus of *Escherichia coli* K12: cloning, genetic, and enzymatic characterization. *J. Biol. Chem* 263, 2409-2416 (1988).
- Leyh, T.S., Vogt, T.F. & Suo, Y. The DNA sequence of the sulfate activation locus from *Escherichia coli* K-12. *J. Biol. Chem* 267, 10405-10410 (1992).
- Li, J., Uversky, V.N. & Fink, A.L. Effect of familial Parkinson's disease point mutations A30P and A53T on the structural properties, aggregation, and fibrillation of human alpha-synuclein. *Biochemistry* 40, 11604-11613 (2001).
- Lindsay, J., Wang, L., Li, Y. & Zhou, S. Structure, function and polymorphism of human cytosolic sulfotransferases. *Curr. Drug Metab* 9, 99-105 (2008).
- Loers, G. & Schachner, M. Recognition molecules and neural repair. *J. Neurochem* 101, 865-882 (2007).
- Logan, H.M., Cathala, N., Grignon, C. & Davidian, J.C. Cloning of a cDNA encoded by a member of the *Arabidopsis thaliana* ATP sulfurylase multigene family. Expression studies in yeast and in relation to plant sulfur nutrition. *J. Biol. Chem* 271, 12227-12233 (1996).
- Long, S.R. *Rhizobium*-legume nodulation: life together in the underground. *Cell* 56, 203-214 (1989).
- Löw, K., Orberger, G., Schmitz, B., Martini, R. & Schachner, M. The L2/HNK-1 carbohydrate is carried by the myelin associated glycoprotein and sulphated glucuronyl glycolipids in muscle but not cutaneous nerves of adult mice. *Eur. J. Neurosci* 6, 1773-1781 (1994).
- Lillie, S.H. & Pringle, J.R. Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: responses to nutrient limitation. *J. Bacteriol* 143, 1384-1394 (1980).
- Lindsay, J., Wang, L., Li, Y. & Zhou, S. Structure, function and polymorphism of human cytosolic sulfotransferases. *Curr. Drug Metab* 9, 99-105 (2008).

Lyle, S., Stanczak, J., Ng, K. & Schwartz, N.B. Rat chondrosarcoma ATP sulfurylase and adenosine 5'-phosphosulfate kinase reside on a single bifunctional protein. *Biochemistry* 33, 5920-5925 (1994).

M

Malý, P.; Thall, A.; Petryniak, B.; Rogers, C. E.; Smith, P. L.; Marks, R. M.; Kelly, R. J.; Gersten, K. M.; Cheng, G.; Saunders, T. L.; Camper, S. A.; Camphausen, R. T.; Sullivan, F. X.; Isogai, Y.; Hindsgaul, O.; von Andrian, U. H. & Lowe, J. B. The alpha(1,3)fucosyltransferase Fuc-TVII controls leukocyte trafficking through an essential role in L-, E-, and P-selectin ligand biosynthesis. *Cell* 86, 643-653 (1996).

Martinez, E., Bartolomé, B. & de la Cruz, F. pACYC184-derived cloning vectors containing the multiple cloning site and lacZ alpha reporter gene of pUC8/9 and pUC18/19 plasmids. *Gene* 68, 159-162 (1988).

Martini, R., Xin, Y., Schmitz, B. & Schachner, M. The L2/HNK-1 Carbohydrate Epitope is Involved in the Preferential Outgrowth of Motor Neurons on Ventral Roots and Motor Nerves. *Eur. J. Neurosci* 4, 628-639 (1992).

Masselot, M. & Surdin-Kerjan, Y. Methionine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. II. Gene-enzyme relationships in the sulfate assimilation pathway. *Mol. Gen. Genet* 154, 23-30 (1977).

McGarry, R.C., Helfand, S.L., Quarles, R.H. & Roder, J.C. Recognition of myelin-associated glycoprotein by the monoclonal antibody HNK-1. *Nature* 306, 376-378 (1983).

Mergaert, P.; D'Haese, W.; Geelen, D.; Promé, D.; Van Montagu, M.; Geremia, R.; Promé, J. C. & Holsters, M. Biosynthesis of *Azorhizobium caulinodans* Nod factors. Study of the activity of the NodABCS proteins by expression of the genes in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem* 270, 29217-29223 (1995).

Mitsuoka, C.; Sawada-Kasugai, M.; Ando-Furui, K.; Izawa, M.; Nakanishi, H.; Nakamura, S.; Ishida, H.; Kiso, M. & Kannagi, R. Identification of a major carbohydrate capping group of the L-selectin ligand on high endothelial venules in human lymph nodes as 6-sulfo sialyl Lewis X. *J. Biol. Chem* 273, 11225-11233 (1998).

Morita, I., Kizuka, Y., Kakuda, S. & Oka, S. Expression and function of the HNK-1 carbohydrate. *J. Biochem* 143, 719-724 (2008).

N

Nagai, K., Tadano-Aritomi, K., Niimura, Y. & Ishizuka, I. Higher expression of renal sulfoglycolipids in marine mammals. *Glycoconj. J* 25, 723-726 (2008).

- Nakano, T., Ito, Y. & Ogawa, T. Synthesis of sulfated glucuronyl glycosphingolipids; carbohydrate epitopes of neural cell-adhesion molecules. *Carbohydr. Res* 243, 43-69 (1993).
- Nakano, T., Betti, M. & Pietrasik, Z. Extraction, isolation and analysis of chondroitin sulfate glycosaminoglycans. *Recent Pat Food Nutr Agric* 2, 61-74 (2010).
- Naumov, G.I. Identification of the lactose LAC gene superfamilies in Kluyveromyces yeast. *Dokl Biochem Biophys* 420, 158-160 (2008).
- Negishi, M.; Pedersen, L. G.; Petrotchenko, E.; Shevtsov, S.; Gorokhov, A.; Kakuta, Y. & Pedersen, L. C. Structure and function of sulfotransferases. *Arch. Biochem. Biophys* 390, 149-157 (2001).
- Neuwald, A. F.; Krishnan, B. R.; Brikun, I.; Kulakauskas, S.; Suziedelis, K.; Tomcsanyi, T.; Leyh, T. S. & Berg, D. E. cysQ, a gene needed for cysteine synthesis in Escherichia coli K-12 only during aerobic growth. *J. Bacteriol* 174, 415-425 (1992).
- Nomura, H., Tator, C.H. & Shoichet, M.S. Bioengineered strategies for spinal cord repair. *J. Neurotrauma* 23, 496-507 (2006).
- Nordlander, R.H. Cellular and subcellular distribution of HNK-1 immunoreactivity in the neural tube of Xenopus. *J. Comp. Neurol* 335, 538-551 (1993).



- O'Donnell, C.D., Kovacs, M., Akhtar, J., Valyi-Nagy, T. & Shukla, D. Expanding the role of 3-O sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus type-1 entry. *Virology* 397, 389-398 (2010).
- Ogawa-Goto, K. et al. Binding of human cytomegalovirus to sulfated glucuronyl glycosphingolipids and their inhibitory effects on the infection. *J. Gen. Virol* 79, 2533-2541 (1998).
- Ong, E., Yeh, J.C., Ding, Y., Hindsgaul, O. & Fukuda, M. Expression cloning of a human sulfotransferase that directs the synthesis of the HNK-1 glycan on the neural cell adhesion molecule and glycolipids. *J. Biol. Chem* 273, 5190-5195 (1998).
- Ong, E.; Yeh, J. C.; Ding, Y.; Hindsgaul, O.; Pedersen, L. C.; Negishi, M. & Fukuda, M. Structure and function of HNK-1 sulfotransferase. Identification of donor and acceptor binding sites by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem* 274, 25608-25612 (1999).
- Ostergaard, S., Olsson, L. & Nielsen, J. Metabolic engineering of Saccharomyces cerevisiae. *Microbiol. Mol. Biol. Rev* 64, 34-50 (2000).
- Ostrowski, J., Jagura-Burdzy, G. & Kredich, N.M. DNA sequences of the cysB regions of Salmonella typhimurium and Escherichia coli. *J. Biol. Chem* 262, 5999-6005 (1987).

P

- Parry, D.A., Flint, M.H., Gillard, G.C. & Craig, A.S. A role for glycosaminoglycans in the development of collagen fibrils. *FEBS Lett* 149, 1-7 (1982).
- Petit, C.; Rigg, G. P.; Pazzani, C.; Smith, A.; Sieberth, V.; Stevens, M.; Boulnois, G.; Jann, K. & Roberts, I. S. Region 2 of the Escherichia coli K5 capsule gene cluster encoding proteins for the biosynthesis of the K5 polysaccharide. *Mol. Microbiol* 17, 611-620 (1995).
- Pierce, J.G. & Parsons, T.F. Glycoprotein hormones: structure and function. *Annu. Rev. Biochem* 50, 465-495 (1981).
- Pieringer, J., Rao, G.S., Mandel, P. & Pieringer, R.A. The association of the sulphogalactosylglycerolipid of rat brain with myelination. *Biochem. J* 166, 421-428 (1977).
- Pikas, D.S., Eriksson, I. & Kjellén, L. Overexpression of different isoforms of glucosaminyl N-deacetylase/N-sulfotransferase results in distinct heparan sulfate N-sulfation patterns. *Biochemistry* 39, 4552-4558 (2000).
- Prabhakar, V. & Sasisekharan, R. The biosynthesis and catabolism of galactosaminoglycans. *Adv. Pharmacol* 53, 69-115 (2006).
- Priem, B., Gilbert, M., Wakarchuk, W.W., Heyraud, A. & Samain, E. A new fermentation process allows large-scale production of human milk oligosaccharides by metabolically engineered bacteria. *Glycobiology* 12, 235-240 (2002).
- Prokof'eva, N.G., Chaikina, E.L., Kicha, A.A. & Ivanchina, N.V. Biological activities of steroid glycosides from starfish. *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol* 134, 695-701 (2003).
- Prydz, K. & Dalen, K.T. Synthesis and sorting of proteoglycans. *J. Cell. Sci* 113 Pt 2, 193-205 (2000).
- Purushothaman, A.; Fukuda, J.; Mizumoto, S.; ten Dam, G. B.; van Kuppevelt, T. H.; Kitagawa, H.; Mikami, T. & Sugahara, K. Functions of chondroitin sulfate/dermatan sulfate chains in brain development. Critical roles of E and iE disaccharide units recognized by a single chain antibody GD3G7. *J. Biol. Chem* 282, 19442-19452 (2007).

R

- Rens-Domiano, S.S. & Roth, J.A. Inhibition of M and P phenol sulfotransferase by analogues of 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate. *J. Neurochem* 48, 1411-1415 (1987).
- Rhodes, K.E. & Fawcett, J.W. Chondroitin sulphate proteoglycans: preventing plasticity or protecting the CNS? *J. Anat* 204, 33-48 (2004).
- Rietsch, A. & Beckwith, J. The genetics of disulfide bond metabolism. *Annu. Rev. Genet* 32, 163-184 (1998).

- Rivera-Marrero, C.A., Ritzenthaler, J.D., Newburn, S.A., Roman, J. & Cummings, R.D. Molecular cloning and expression of a novel glycolipid sulfotransferase in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology (Reading, Engl.)* 148, 783-792 (2002).
- Roche, P., Lerouge, P., Ponthus, C. & Promé, J.C. Structural determination of bacterial nodulation factors involved in the *Rhizobium meliloti*-alfalfa symbiosis. *J. Biol. Chem* 266, 10933-10940 (1991).
- Roche, P.; Debelle, F.; Maillet, F.; Lerouge, P.; Faucher, C.; Truchet, G.; Dénarié, J. & Promé, J. C.Molecular basis of symbiotic host specificity in *Rhizobium meliloti*: nodH and nodPQ genes encode the sulfation of lipo-oligosaccharide signals. *Cell* 67, 1131-1143 (1991).
- Rubio-Teixeira, M., Arévalo-Rodríguez, M., Lequerica, J.L. & Polaina, J. Lactose utilization by *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing *Kluyveromyces lactis* LAC genes. *J. Biotechnol* 84, 97-106 (2001).



- Sahin-Tóth, M., Akhoun, K.M., Runner, J. & Kaback, H.R. Ligand recognition by the lactose permease of *Escherichia coli*: specificity and affinity are defined by distinct structural elements of galactopyranosides. *Biochemistry* 39, 5097-5103 (2000).
- Samain, E., Drouillard, S., Heyraud, A., Driguez, H. & Geremia, R.A. Gram-scale synthesis of recombinant chitooligosaccharides in *Escherichia coli*. *Carbohydr. Res* 302, 35-42 (1997).
- Samain, E., Chazalet, V. & Geremia, R.A. Production of O-acetylated and sulfated chitooligosaccharides by recombinant *Escherichia coli* strains harboring different combinations of nod genes. *J. Biotechnol* 72, 33-47 (1999).
- Sasisekharan, R., Raman, R. & Prabhakar, V. Glycomics approach to structure-function relationships of glycosaminoglycans. *Annu Rev Biomed Eng* 8, 181-231 (2006).
- Schachner, M. & Martini, R. Glycans and the modulation of neural-recognition molecule function. *Trends in Neurosciences* 18, 183-191 (1995).
- Schaefer, L. & Schaefer, R.M. Proteoglycans: from structural compounds to signaling molecules. *Cell Tissue Res* 339, 237-246 (2010).
- Schimz, K.L. The effect of sulfite on the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol* 125, 89-95 (1980).
- Schmidt, J.T. & Schachner, M. Role for cell adhesion and glycosyl (HNK-1 and oligomannoside) recognition in the sharpening of the regenerating retinotectal projection in goldfish. *J. Neurobiol* 37, 659-671 (1998).
- Schmitz, B., Schachner, M., Ito, Y., Nakano, T. & Ogawa, T. Determination of structural elements of the L2/HNK-1 carbohydrate epitope required for its function. *Glycoconj. J* 11, 345-352 (1994).

- Schriek, U. & Schwenn, J.D. Properties of the purified APS-kinase from *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol* 145, 32-38 (1986).
- Schultz, L. D.; Hofmann, K. J.; Mylin, L. M.; Montgomery, D. L.; Ellis, R. W. & Hopper, J. E. Regulated overproduction of the GAL4 gene product greatly increases expression from galactose-inducible promoters on multi-copy expression vectors in yeast. *Gene* 61, 123-133 (1987).
- Schultze, M.; Staehelin, C.; Röhrig, H.; John, M.; Schmidt, J.; Kondorosi, E.; Schell, J. & Kondorosi, A. In vitro sulfotransferase activity of *Rhizobium meliloti* NodH protein: lipochitooligosaccharide nodulation signals are sulfated after synthesis of the core structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 92, 2706-2709 (1995).
- Schwarz, J.K., Capasso, J.M. & Hirschberg, C.B. Translocation of adenosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate into rat liver Golgi vesicles. *J. Biol. Chem* 259, 3554-3559 (1984).
- Schwedock, J.S., Liu, C., Leyh, T.S. & Long, S.R. *Rhizobium meliloti* NodP and NodQ form a multifunctional sulfate-activating complex requiring GTP for activity. *J. Bacteriol* 176, 7055-7064 (1994).
- Schwedock, J. & Long, S.R. ATP sulphurylase activity of the nodP and nodQ gene products of *Rhizobium meliloti*. *Nature* 348, 644-647 (1990).
- Schwedock, J.S. & Long, S.R. *Rhizobium meliloti* genes involved in sulfate activation: the two copies of nodPQ and a new locus, saa. *Genetics* 132, 899-909 (1992).
- Seko, A. & Yamashita, K. Characterization of a novel galactose beta1,3-N-acetylglucosaminyltransferase (beta3Gn-T8): the complex formation of beta3Gn-T2 and beta3Gn-T8 enhances enzymatic activity. *Glycobiology* 15, 943-951 (2005).
- Shibata, S.; Takagaki, K.; Nakamura, T.; Izumi, J.; Kojima, K.; Kato, I. & Endo, M. HNK-1-reactive novel oligosaccharide, sulfate-O-3GlcA beta 1-4Xyl beta 1-(4-methylumbelliferone), synthesized by cultured human skin fibroblasts. *J. Biol. Chem* 270, 13794-13798 (1995).
- Simova, O.; Irintchev, A.; Mehanna, A.; Liu, J.; Dihné, M.; Bächle, D.; Sewald, N.; Loers, G. & Schachner, M. Carbohydrate mimics promote functional recovery after peripheral nerve repair. *Ann. Neurol* 60, 430-437 (2006).
- Slomiany, B.L., Slomiany, A. & Horowitz, M.I. Sulfatides of hog gastric mucosa. *Biochim. Biophys. Acta* 348, 388-396 (1974).
- Smith, D. W.; Johnson, K. A.; Bingman, C. A.; Aceti, D. J.; Blommel, P. G.; Wrobel, R. L.; Frederick, R. O.; Zhao, Q.; Sreenath, H.; Fox, B. G.; Volkman, B. F.; Jeon, W. B.; Newman, C. S.; Ulrich, E. L.; Hegeman, A. D.; Kimball, T.; Thao, S.; Sussman, M. R.; Markley, J. L. & Phillips, G. N. Crystal structure of At2g03760, a putative steroid sulfotransferase from *Arabidopsis thaliana*. *Proteins* 57, 854-857 (2004).

- Snow, D.M., Steindler, D.A. & Silver, J. Molecular and cellular characterization of the glial roof plate of the spinal cord and optic tectum: a possible role for a proteoglycan in the development of an axon barrier. *Dev. Biol* 138, 359-376 (1990).
- Snow, A.D. & Wight, T.N. Proteoglycans in the pathogenesis of Alzheimer's disease and other amyloidoses. *Neurobiol. Aging* 10, 481-497 (1989).
- Stevenson, G., Andrianopoulos, K., Hobbs, M. & Reeves, P.R. Organization of the Escherichia coli K-12 gene cluster responsible for production of the extracellular polysaccharide colanic acid. *J. Bacteriol* 178, 4885-4893 (1996).
- Stockell Hartree, A. & Renwick, A.G. Molecular structures of glycoprotein hormones and functions of their carbohydrate components. *Biochem. J* 287, 665-679 (1992).

T

- Thomas, D., Barbey, R. & Surdin-Kerjan, Y. Gene-enzyme relationship in the sulfate assimilation pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. Study of the 3'-phosphoadenylylsulfate reductase structural gene. *J. Biol. Chem* 265, 15518-15524 (1990).
- Thomas, D. & Surdin-Kerjan, Y. Metabolism of sulfur amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev* 61, 503-532 (1997).
- Tokuda, A.; Ariga, T.; Isogai, Y.; Komba, S.; Kiso, M.; Hasegawa, A.; Tai, T. & Yu, R. On the Specificity of Anti-Sulfoglucuronosyl Glycolipid Antibodies. *J. of Carbohydrate Chem.* 17, 535-546 (1998).
- Townsend, G.E., Forsberg, L.S. & Keating, D.H. *Mesorhizobium loti* produces nodPQ-dependent sulfated cell surface polysaccharides. *J. Bacteriol* 188, 8560-8572 (2006).
- Townsend, G.E. & Keating, D.H. Identification and characterization of KpsS, a novel polysaccharide sulphotransferase in *Mesorhizobium loti*. *Mol. Microbiol* 68, 1149-1164 (2008).

U

- Uchimura, K.; Muramatsu, H.; Kadomatsu, K.; Fan, Q. W.; Kurosawa, N.; Mitsuoka, C.; Kannagi, R.; Habuchi, O. & Muramatsu, T. Molecular cloning and characterization of an N-acetylglucosamine-6-O-sulfotransferase. *J. Biol. Chem* 273, 22577-22583 (1998).
- Uchimura, K.; Muramatsu, H.; Kaname, T.; Ogawa, H.; Yamakawa, T.; Fan, Q. W.; Mitsuoka, C.; Kannagi, R.; Habuchi, O.; Yokoyama, I.; Yamamura, K.; Ozaki, T.; Nakagawara, A.; Kadomatsu, K. & Muramatsu, T. Human N-acetylglucosamine-6-O-sulfotransferase involved in the biosynthesis of 6-sulfo sialyl Lewis X: molecular cloning, chromosomal mapping, and expression in various organs and tumor cells. *J. Biochem* 124, 670-678 (1998).

Uchimura, K.; El-Fasakhany, F. M.; Hori, M.; Hemmerich, S.; Blink, S. E.; Kansas, G. S.; Kanamori, A.; Kumamoto, K.; Kannagi, R. & Muramatsu, T. Specificities of N-acetylglucosamine-6-O-sulfotransferases in relation to L-selectin ligand synthesis and tumor-associated enzyme expression. *J. Biol. Chem* 277, 3979-3984 (2002).

V

Van Vactor, D., Wall, D.P. & Johnson, K.G. Heparan sulfate proteoglycans and the emergence of neuronal connectivity. *Curr. Opin. Neurobiol* 16, 40-51 (2006).

Voshol, H., van Zuylen, C.W., Orberger, G., Vliegthart, J.F. & Schachner, M. Structure of the HNK-1 carbohydrate epitope on bovine peripheral myelin glycoprotein P0. *J. Biol. Chem* 271, 22957-22960 (1996).

W

Weinshilboum, R. M.; Otterness, D. M.; Aksoy, I. A.; Wood, T. C.; Her, C. & Raftogianis, R. B. Sulfation and sulfotransferases 1: Sulfotransferase molecular biology: cDNAs and genes. *FASEB J* 11, 3-14 (1997).

Wong, K.P., Khoo, B.Y. & Sit, K.H. Biosynthesis of PAPS in vitro by human liver. Measurement by two independent assay procedures. *Biochem. Pharmacol* 41, 63-69 (1991).

Y

Yanisch-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33, 103-119 (1985).

Yavuz, E., Drouillard, S., Samain, E., Roberts, I. & Priem, B. Glucuronylation in *Escherichia coli* for the bacterial synthesis of the carbohydrate moiety of nonsulfated HNK-1. *Glycobiology* 18, 152-157 (2008).

**COMMUNICATIONS A
DES CONGRES
SCIENTIFIQUES**

« Chemo-bacterial synthesis of brain carbohydrate HNK-1 analogue conjugates », Bastide Ludovic, Fort Sébastien, Priem Bernard. **8th Carbohydrate Bioengineering Meeting, Ischia, Italy** (10-13 May 2009).

« Chemo-bacterial synthesis of brain carbohydrate HNK-1 analogue conjugates », Bastide Ludovic, Fort Sébastien, Priem Bernard. **Journée de l'Ecole Doctorale, Grenoble, France** (16 juin 2009).

« Synthèse et activité biologique de glycoconjugués sulfatés HNK-1 », Bastide Ludovic, Priem Bernard, Fort Sébastien. **23^{ème} Journée du Groupe Français des Glucides, Cap-Hornu, France** (17-20 mai 2010).