



# Caractérisation de la fucosyltransférase du xyloglucane d'*Arabidopsis thaliana* “ AtFuT1 ” : étude biochimique et structurale

Félix Cicéron

## ► To cite this version:

Félix Cicéron. Caractérisation de la fucosyltransférase du xyloglucane d'*Arabidopsis thaliana* “ AtFuT1 ” : étude biochimique et structurale. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Grenoble Alpes, 2015. Français. NNT : 2015GREAV020 . tel-01551132

**HAL Id: tel-01551132**

**<https://theses.hal.science/tel-01551132>**

Submitted on 30 Jun 2017

**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 : **Biochimie végétale**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

**Félix CICÉRON**

Thèse dirigée par **Olivier LEROUXEL**

codirigée par **Christelle BRETON**

Préparée au sein du **Laboratoire CERMAV (Centre de Recherche sur les Macromolécules Végétales)**

dans l'École Doctorale de Chimie et Sciences du Vivant

## **Caractérisation de la fucosyltransférase du xyloglucane d'*Arabidopsis thaliana* « AtFuT1 » : étude biochimique et structurale**

Thèse soutenue publiquement le **15 décembre 2015**,  
devant le jury composé de :

**M. Serge PEREZ**

Directeur de recherche émérite, Université Grenoble-Alpes, Président du jury

**Mme Catherine RAYON**

Maître de conférences, Université de Picardie Jules Verne, Rapportrice

**Mme Muriel BARDOR**

Professeur des Universités, Université de Rouen, Rapportrice

**Mme Claire DUMON**

Chargée de recherche, INSA de Toulouse, examinatrice

**M. Olivier LEROUXEL**

Maître de conférences, Université Grenoble-Alpes, examinateur

**Mme Christelle BRETON**

Professeur des Universités, Université Grenoble Alpes, examinatrice





# Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Olivier Lerouxel et Christelle Breton, sans qui rien de ce cette aventure n'aurait été possible. Merci d'avoir cru en moi pour défendre ce projet de thèse auprès de l'école doctorale, puis de m'avoir apporté confiance et liberté d'action durant ces trois ans. J'ai apprécié la disponibilité dont vous avez fait preuve à chaque fois que je suis venu frapper à vos portes. Je remercie particulièrement Olivier, pour son écoute et pour le partage de ses idées au quotidien. Merci à Christelle, dont l'expérience apporte à la stratégie autant qu'à l'analyse du moindre résultat un verdict qui tombe, aussi judicieux que difficilement contestable ! J'ai apprécié d'être encadré de manière souple, avec toutefois un suivi bienveillant de la part d'Olivier pour les échéances importantes, partageant volontiers son sens de l'organisation et sa rigueur normande !

Je tiens aussi à témoigner ma reconnaissance à l'équipe de glycobiochimie pour son accueil chaleureux. Merci pour les petites pauses animées, les partages d'astuces, les repas conviviaux, bref, tout ce qui donne plaisir à aller au travail, notamment dans les moments difficiles du projet où la stimulation scientifique faiblit !

Plus largement, je remercie l'ensemble des membres du CERMAV, particulièrement les stagiaires, doctorants et post-doctorants, pour l'ambiance conviviale dont j'ai pu profiter durant ces trois années.

Je souhaite mentionner et remercier vivement les personnes qui ont contribué, à différents niveaux d'implications, à l'avancement de ce projet. Tout d'abord : Joana Rocha et Daniele de Sanctis pour leur aide à la réalisation des cristaux de protéine et pour la résolution de la structure. Valérie Chazalet, pour ses partages d'expériences et sa gestion au quotidien du laboratoire. Merci à nos collaborateurs de l'INAC (CEA) : Thierry Livache, André Roget et Raphaël Matthey, pour leur accueil chaleureux dans leur équipe et pour avoir supervisé les séries de tests que j'ai effectuées sur place. Merci au Dr Claire Boisset et à Laurine Buon, de la plateforme chromatographie du CERMAV, de nous avoir fourni le xyloglucane, ainsi que pour les nombreuses analyses. Merci au Dr Anne Imberty, experte de la technique d'ITC et responsable de l'équipe, d'avoir chapeauté les expériences d'interaction enzyme-substrat ainsi qu'à Émilie Gillon, spécialiste des machines ITC200 et VP ITC, de les avoir réalisées. Merci aux membres de mon comité de suivi de thèse : Patrice Lerouge, André Roget et Nicolas Tarbouriech, d'avoir donné leurs avis sur les orientations à prendre ainsi que des conseils techniques et humains, le tout de manière très professionnelle.

La vie du doctorant peut parfois être difficile lorsque les attentes sont fortes et que les résultats espérés n'arrivent pas... Heureusement beaucoup de gens très bien n'attendent que vous pour s'impliquer à leur côté dans nombre d'événement professionnels, culturels, sportifs,... Je remercie à ce titre tous les membres actifs de Glob'Alps, l'association des doctorants et jeunes chercheurs en Chimie et Science du Vivant de Grenoble ! Un grand merci aussi à ma famille, mes amis, ainsi qu'à mes proches de Grenoble (ils se reconnaîtront...) de m'avoir encouragé tout au long de cette aventure. Sans vous, je n'aurais pas autant savouré la vie dans ce bel environnement des Alpes !

Enfin, je remercie chaleureusement les membres de mon jury de thèse. J'ai pu remarquer lors de l'oral que tous avaient lu le dossier avec attention. Grâce à leur investissement, bénévole, j'ai eu la satisfaction de pouvoir échanger longuement à propos d'un sujet auquel j'ai travaillé trois longues années, merci !!



# Résumé – Abstract

Les fucosyltransférases sont les enzymes responsables du transfert d'un groupement fucose à partir du GDP-fucose sur des accepteurs variés (oligosaccharides, protéines,...). Chez l'homme, les rôles de ces glycosyltransférases sont importants dans un grand nombre de processus biologiques et pathologiques. De nombreuses fucosyltransférases existent chez les végétaux. Notamment FuT1, qui transfère un fucose en  $\alpha 1,2$  sur un résidu galactose du xyloglucane : l'une des hémicelluloses majeures de la paroi des dicotylédones. Ce polysaccharide ramifié est très étudié en raison de ses applications actuelles et potentielles dans différents secteurs de l'industrie : textile, alimentation, pharmaceutique, etc. Les objectifs de ce doctorat ont été d'obtenir des informations biochimiques et structurales sur la fucosyltransférase AtFuT1 de la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. Pour cela, une forme recombinante soluble de l'enzyme a été produite avec le système baculovirus/cellules d'insectes. De manière à obtenir suffisamment de protéines pour les études structurales, une méthode de culture en suspension des cellules a été mise en place au laboratoire. Un protocole de purification en deux étapes, impliquant une chromatographie par affinité puis par exclusion de taille, a permis d'obtenir à partir d'un litre de culture cellulaire entre un à deux mg de protéine pure et homogène. Ce résultat a permis de mieux comprendre le comportement de l'enzyme vis-à-vis de ses substrats (GDP-fucose et xyloglucane), d'obtenir des cristaux de la protéine et de résoudre la structure 3D d'AtFuT1 en complexe avec le GDP et un oligosaccharide dérivé du xyloglucane, à une résolution de 2,2 Å. La forme AtFuT1 produite se comporte en solution et dans le cristal sous forme d'un dimère non covalent. La protéine adopte un repliement qui est un variant du type GT-B classique. Parallèlement à ces travaux, des tests d'activité glycosyltransférase ont été mis au point permettant le criblage de nombreuses conditions de réactions. L'ensemble des méthodes et techniques développées constitue une base utile, devant faciliter la caractérisation d'autres glycosyltransférases.

Fucosyltransferases are enzymes that transfer a fucose residue from GDP-fucose on varied acceptors (oligosaccharides, proteins). In Human, these glycosyltransferases are involved in many biological and pathological processes. Numerous fucosyltransferase exist in the plant kingdom. Among them, FuT1 transfers a fucose linked in  $\alpha 1,2$  onto a galactose of xyloglucan: a major hemicellulose of dicots cell wall. This branched polysaccharide is intensively studied because of its current and potential industrial applications in textile, food, pharmaceuticals, etc. The main objective of this PhD program was to obtain biochemical and structural information on the fucosyltransferase AtFuT1 from the model plant *Arabidopsis thaliana*. A recombinant form of this protein has therefore been produced, using the baculovirus/insect cell system. In order to get sufficient amount of protein for structural studies, a suspension cell culture method has been set-up in the lab. A two-step purification protocol, involving affinity and size exclusion chromatography was established. The active, and highly pure recovered protein was used to determine the biochemical properties of the protein towards its substrates (GDP-fucose and xyloglucan), to get protein crystals and hence to solve its 3D structure in complex with GDP and a xyloglucan derived oligosaccharide (2.2 Å resolution). AtFuT1 behaves in solution and *in crystallo* as a non-covalent dimer. The protein adopts a variant of the classical GTB fold. In addition, novel glycosyltransferase assay have been designed allowing the screening of numerous reaction conditions. Methods and techniques that were developed during this study should be a useful base for the characterization of other glycosyltransferase.



---

# **TABLE DES MATIERES**

---



---

# TABLE DES MATIERES

---

|                                                                                  |           |
|----------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Résumé – Abstract.....</b>                                                    | <b>3</b>  |
| <b>LISTE DES FIGURES .....</b>                                                   | <b>3</b>  |
| <b>LISTE DES FIGURES .....</b>                                                   | <b>5</b>  |
| <b>I. Introduction .....</b>                                                     | <b>23</b> |
| <b>I.1. Les glycosyltransférases.....</b>                                        | <b>23</b> |
| I.1.1. Définition .....                                                          | 23        |
| I.1.2. Classification des GTs .....                                              | 25        |
| I.1.3. Structures et mécanismes réactionnels.....                                | 26        |
| <b>I.2. Caractérisation biochimique et structurale des GTs .....</b>             | <b>30</b> |
| I.2.1. La recherche d'activité GTs .....                                         | 30        |
| I.2.2. Production de GTs eucaryotes pour la cristallisation.....                 | 36        |
| I.2.3. Utilisation des GTs pour la biotechnologie.....                           | 43        |
| <b>I.3. La paroi primaire des eudicotylédones.....</b>                           | <b>47</b> |
| I.3.1. Description et rôle de la paroi primaire .....                            | 47        |
| I.3.2. Les polysaccharides de la paroi végétale .....                            | 50        |
| I.3.3. Synthèse, dépôt et modification des polysaccharides pariétaux.....        | 58        |
| <b>I.4. Caractérisation de glycosyltransférases pariétales .....</b>             | <b>61</b> |
| I.4.1. Spécificités et enjeux.....                                               | 61        |
| I.4.2. Les glycosyltransférases impliquées dans la synthèse du Xyloglucane ..... | 63        |
| I.4.3. <i>Arabidopsis thaliana</i> fucosyltransférase 1 (AtFuT1) .....           | 67        |
| <b>I.5. Objectifs de ce doctorat .....</b>                                       | <b>67</b> |
| <b>II. Production d'AtFuT1 en système hétérologue.....</b>                       | <b>73</b> |
| <b>II.1. Analyse bioinformatique et tests préliminaires.....</b>                 | <b>73</b> |
| II.1.1. Observations de la séquence primaire .....                               | 73        |
| II.1.2. Expression de formes tronquées d'AtFuT1 .....                            | 77        |
| <b>II.2. Expression de AtFuT1 chez Escherichia coli .....</b>                    | <b>80</b> |
| II.2.1. Variations de conditions d'induction et de solubilisation.....           | 80        |
| II.2.2. Utilisation de protéines de fusion.....                                  | 83        |
| II.2.3. Bilan des tests d'expression .....                                       | 85        |
| <b>II.3. Production d'AtFuT1 en cellules d'insectes .....</b>                    | <b>86</b> |
| II.3.1. Production en cellules adhérentes .....                                  | 87        |
| II.3.2. Mise en place d'une méthode de culture en suspension.....                | 90        |

|                                                                                                    |            |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| II.3.3. Comparaison des systèmes des cultures employés.....                                        | 93         |
| <b>III. Purification d'AtFuT1.....</b>                                                             | <b>97</b>  |
| III.1. Tests préliminaires.....                                                                    | 97         |
| III.2. Purification sur colonne IMAC adaptée au milieu de culture eucaryote .....                  | 100        |
| III.3. Optimisation du protocole de purification de AtFuT1 par IMAC.....                           | 101        |
| III.3.1. Importance de l'ajustement du pH du milieu de culture .....                               | 102        |
| III.3.2. Comparaison des colonnes « HisTrap™ Excel » et « cOmplete™ HisTag » .....                 | 102        |
| III.3.3. Purifications à partir de volumes importants.....                                         | 104        |
| III.4. Protocole final de purification par chromatographie IMAC.....                               | 106        |
| III.5. Filtration sur gel.....                                                                     | 109        |
| <b>IV. Caractérisation biochimique d'AtFuT1 .....</b>                                              | <b>113</b> |
| IV.1. Activité enzymatique d'AtFuT1 purifiée .....                                                 | 113        |
| IV.1.1. Un nouveau test de dosage d'activité.....                                                  | 113        |
| IV.1.2. Conservation de la protéine.....                                                           | 118        |
| IV.1.3. Test de transfert sur des oligosaccharides.....                                            | 119        |
| IV.2. Etude du comportement d'AtFuT1 par DLS .....                                                 | 120        |
| IV.3. Caractérisation des deux formes purifiées .....                                              | 122        |
| IV.4. Titration calorimétrique isotherme (ITC) d'AtFuT1.....                                       | 128        |
| <b>V. Recherche de nouveaux tests de criblage d'activité GT .....</b>                              | <b>133</b> |
| V.1. Criblage par dosage du phosphate.....                                                         | 133        |
| V.2. Détection d'interactions glycosyltransférase - accepteur par SPRi .....                       | 140        |
| V.3. Bioluminescence.....                                                                          | 145        |
| V.4. Conclusion.....                                                                               | 146        |
| <b>VI. Cristallisation d'AtFuT1.....</b>                                                           | <b>151</b> |
| VI.1. Obtention de cristaux .....                                                                  | 151        |
| VI.2. Résolution de la structure.....                                                              | 155        |
| VI.2.1. Obtention de cristaux dérivés pour le phasage expérimental .....                           | 155        |
| VI.2.2. Obtention de complexe enzyme substrat.....                                                 | 157        |
| VI.3. Observations structurales préliminaires .....                                                | 158        |
| VI.3.1. Architecture de l'enzyme .....                                                             | 158        |
| VI.3.2. Interaction entre AtFuT1 <sub>Δ68</sub> et ses substrats.....                              | 160        |
| <b>VII. Conclusions perspectives .....</b>                                                         | <b>165</b> |
| <b>VIII. Matériels et Méthodes.....</b>                                                            | <b>175</b> |
| VIII.1. Clonage et tests de production de protéines en bactéries .....                             | 175        |
| VIII.2. Clonage et expression de protéines avec le système baculovirus/cellules<br>d'insectes..... | 178        |
| VIII.3. Techniques de biochimie.....                                                               | 186        |
| VIII.4. Imagerie de résonance des plasmons de surface (SPR).....                                   | 191        |
| VIII.5. Principe de la cristallisation des protéines.....                                          | 194        |
| <b>IX. Bibliographie.....</b>                                                                      | <b>203</b> |

---

## **LISTE DES FIGURES**

---



---

# LISTE DES FIGURES

---

|                                                                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figure I.1 Principe d'une réaction glycosyltransférase.....                                                               | 23 |
| Figure I.2 : Représentation schématique d'une glycosyltransférase. ....                                                   | 24 |
| Figure I.3 : Inversion et conservation de l'anométrie du groupement transféré par une GT<br>.....                         | 26 |
| Figure I.4 : Les deux grands types de repliements observés chez les glycosyltransférases.<br>.....                        | 27 |
| Figure I.5 : Flexibilité conformationnelle des glycosyltransférases. ....                                                 | 28 |
| Figure I.6 : Schéma représentant un mécanisme d'action d'une GT-A "inverting".....                                        | 29 |
| Figure I.7 : Exemple de test de détection d'activité GT basé sur la fluorescence.....                                     | 32 |
| Figure I.8 : Test d'activité GT par détection du phosphate.....                                                           | 34 |
| Figure I.9 : Aperçu général de recherche d'activité enzymatique par spectrométrie de<br>masse à imagerie.....             | 35 |
| Figure I.10 : N-glycannes de différents organismes couramment utilisés pour produire<br>des protéines recombinantes. .... | 39 |
| Figure I.11 : Paroi cellulaire et vacuole.....                                                                            | 47 |
| Figure I.12 : La paroi conditionne la forme et les propriétés mécaniques des cellules<br>végétales. ....                  | 48 |
| Figure I.13 : Paroi primaire, secondaire et lamelle moyenne entre deux cellules<br>végétales. ....                        | 49 |
| Figure I.14 : Schéma des polysaccharides de la paroi primaire d'une cellule d'<br><i>Arabidopsis</i> .....                | 50 |

|                                                                                                                                                      |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figure I.15 : image de microfibrilles de cellulose.....                                                                                              | 51 |
| Figure I.16 : Structures d'hémicelluloses principalement rencontrées chez les plantes terrestres.....                                                | 52 |
| Figure I.17 : Nomenclature pour les oligosaccharides issus de xyloglucane.....                                                                       | 54 |
| Figure I.18 : Détection d'épitopes de xyloglucane par immnofluorescence.....                                                                         | 55 |
| Figure I.19 : Structures de pectines.....                                                                                                            | 56 |
| Figure I.20 : Modèle de la boîte à œufs où le calcium interconnecte les homogalacturonanes.....                                                      | 57 |
| Figure I.21 : Machinerie de synthèse de la cellulose.....                                                                                            | 59 |
| Figure I.22 : Principaux types de GTs golgiennes des plantes d'interactions supposées.....                                                           | 60 |
| Figure I.23 : représentation simplifiée du trafic membranaire post-Golgi et du dépôt des polysaccharides dans la paroi végétale.....                 | 61 |
| Figure I.24 : différentes approches pour la caractérisation d'activité GT.....                                                                       | 62 |
| Figure I.25 : Glycosyltransférases identifiées de la synthèse de xyloglucane .....                                                                   | 64 |
| Figure I.26 : Modèle prédominant de la biosynthèse du xyloglucane au niveau de l'appareil de Golgi.....                                              | 66 |
| Figure II.1 : analyse de la séquence AtFuT1 sur le serveur PHYRE2 .....                                                                              | 74 |
| Figure II.2 : séquence primaire d'AtFuT1. Chaîne d'acides aminés issue de l'ADNc disponible sur la ressource "TAIR" .....                            | 76 |
| Figure II.3 : ADN codant et protéine correspondante à AtFuT1 <sub>Δ68</sub> , clonée dans le vecteur pVT-Bac-His.....                                | 78 |
| Figure II.4 : expression hétérologue de deux constructions d'AtFuT1 tronquée en système baculovirus/cellules d'insectes.....                         | 79 |
| Figure II.5 : expression de AtFuT1 <sub>Δ68</sub> et AtFuT1 <sub>Δ93</sub> clonées dans le plasmide pET-TEV, avec la souche <i>E. coli</i> BL21..... | 81 |
| Figure II.6 : Expression des constructions pET32-TEV-AtFuT1 <sub>Δ68</sub> et pET32-TEV-AtFuT1 <sub>Δ93</sub> en bactéries OrigamiB. ....            | 84 |

|                                                                                                                                             |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figure II.7 : Expression des constructions pBADM41-AtFuT1 <sub>Δ68</sub> et pBADM41-AtFuT1 <sub>Δ93</sub> en cellules BL21 et OrigamiB..... | 84  |
| Figure II.8 : recherche d'activité fucosyltransférase sur les fractions solubles des productions d'AtFuT1 <sub>Δ68</sub> en bactéries.....  | 86  |
| Figure II.9 : illustration des souches de cellules d'insectes, milieux et flasques utilisés au laboratoire.....                             | 87  |
| Figure II.10 : Une production de 900 ml de milieu Express-five avec des cultivées en adhérence.....                                         | 89  |
| Figure II.11 : Culture des cellules d'insectes High-five en milieu Ex-Cell 405 dans un bioréacteur.....                                     | 93  |
| Figure III.1 : Tentative de purification d'AtFuT1 sur HisTrap FF (GE) à partir de 740 ml de milieu Ex-Cell 405.....                         | 99  |
| Figure III.2 : Purification d'AtFuT1 sur colonne HisTrap <sup>TM</sup> excel (GE) à partir de 740 ml de milieu Ex-Cell 405.....             | 100 |
| Figure III.3 : Colonnes 1 ml HisTrap <sup>TM</sup> excel (gauche) et HisTrap FF (droite) utilisées une fois, avec le même échantillon.....  | 101 |
| Figure III.4 : Purification d'AtFuT1 sur colonne cOmplete <sup>TM</sup> His-Tag (Roche) à partir de 40 ml de milieu Express-five.....       | 103 |
| Figure III.5 : Purification d'AtFuT1 sur colonne HisTrap <sup>TM</sup> excel (Roche) à partir de 40 ml de milieu Express-five.....          | 103 |
| Figure III.6 : Purification d'AtFuT1 à partir de 500 ml de milieu Express-five produits en adhérence (boîtes Nunc). .....                   | 105 |
| Figure III.7 : détermination de la valeur la plus élevée de pH à ajuster avec le milieu Ex-Cell 405.....                                    | 106 |
| Figure III.8 : Étapes de préparation de l'échantillon à partir de la décongélation du milieu et jusqu'à l'injection.....                    | 107 |
| Figure III.9 : Purification typique d'AtFuT1 à partir de 1,4 L de milieu de culture Ex-Cell 405.....                                        | 108 |
| Figure III.10 : Purification d'AtFuT1 par chromatographie d'exclusion de taille.....                                                        | 109 |

|                                                                                                                      |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figure IV.1 : Principe du kit « GDP-Glo™ Glycosyltransferase Assay » de Promega.....                                 | 114 |
| Figure IV.2 : Sensibilité, bruit de fond et gamme de détection du test d'activité d'AtFuT1 avec GDP-Glo.....         | 115 |
| Figure IV.3 : Détermination de la concentration d'AtFuT1 et du temps de réaction pour les tests d'affinités. ....    | 116 |
| Figure IV.4 : Mesures de vitesses initiales à différentes concentrations de substrats. ...                           | 117 |
| Figure IV.5 : Détermination des paramètres cinétiques par la représentation en double inverse $1/V$ et $1/[S]$ ..... | 117 |
| Figure IV.6 : Comparaison de l'activité de différents lots d'AtFuT1 .....                                            | 119 |
| Figure IV.7 : Contrôle d'échantillons d'AtFuT1 purifiée par DLS.....                                                 | 121 |
| Figure IV.8 : Analyse d'AtFuT1 par SDS-PAGE en conditions réductrices (R+) et non réductrices (R-).....              | 123 |
| Figure IV.9 : Spectre MALDI-TOF d'échantillons d'AtFuT1. ....                                                        | 124 |
| Figure IV.10 : Quatre N-glycannes majoritaires des cellules High-Five.....                                           | 125 |
| Figure IV.11 : test de déglycosylation d'AtFuT1.....                                                                 | 125 |
| Figure IV.12 : Résultat du séquençage N-terminale des formes purifiées d'AtFuT1 .....                                | 126 |
| Figure IV.13 : différentes formes possibles d'AtFuT1 dans les échantillons purifiés. ....                            | 127 |
| Figure IV.14 : titration calorimétrique isotherme d'AtFuT1 .....                                                     | 129 |
| Figure V.1 : Principe du dosage d'activité GT par mesure du phosphate.....                                           | 134 |
| Figure V.2 : comparaison des courbes d'étalonnage de deux solutions réactives à base de malachite. ....              | 135 |
| Figure V.3 : Gammes étalon de GDP avec différentes dilutions de phosphatase .....                                    | 136 |
| Figure V.4 : Test de détection d'activité FucT en présence de différents accepteurs. ....                            | 138 |
| Figure V.5 : Contrôle des réactifs et mesure d'activité d'AtFuT1 avec le test de détection à la malachite.....       | 139 |
| Figure V.6 : Plan de disposition de plots d'oligosaccharides.....                                                    | 141 |

|                                                                                                                              |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figure V.7 : Sensorgramme correspondant au passage de l'anticorps contrôle LM5.....                                          | 143 |
| Figure V.8 : Sensorgramme correspondant à l'ajout de 280 nM de lectine UEA1 spécifique du fucose. ....                       | 143 |
| Figure V.9 : sensorgramme correspondant à l'injection de 800 nM d'AtFuT1 .....                                               | 144 |
| Figure V.10 : gammes de GDP mesurées à deux jours d'intervalle chacune.....                                                  | 145 |
| Figure VI.1 : Schémas des conditions permettant d'obtenir des cristaux d'AtFuT1. ....                                        | 152 |
| Figure VI.2 : Allure des cristaux d'AtFuT1 fréquemment obtenus.....                                                          | 153 |
| Figure VI.3 : Cristaux d'AtFuT1 fixé à une membrane.....                                                                     | 153 |
| Figure VI.4 : Organisation d'AtFuT1 dans le cristal .....                                                                    | 158 |
| Figure VI.5 : Structure du monomère d'AtFuT1 <sub>Δ68</sub> .....                                                            | 159 |
| Figure VI.6 : Représentation du dimère d'AtFuT1 <sub>Δ68</sub> .....                                                         | 159 |
| Figure VI.7 : AtFuT1 <sub>Δ68</sub> en complexe avec GDP et XLLG .....                                                       | 160 |
| Figure VI.8 : Détails moléculaires de l'interaction entre AtFuT1 <sub>Δ68</sub> et le GDP .....                              | 161 |
| Figure VI.9 : Nomenclature des résidus formant le motif XLLG.....                                                            | 161 |
| Figure VI.10 : Détails moléculaires de l'interaction d'AtFuT1 <sub>Δ68</sub> avec l'accepteur XLLG .....                     | 162 |
| Figure VIII.1 : Illustration du système d'induction à l'IPTG utilisé avec les souches E. coli DE3 et les plasmides pET. .... | 175 |
| Figure VIII.2 : Vecteur de transfert pVT-Bac-His utilisé pour le clonage d'AtFuT1.....                                       | 179 |
| Figure VIII.3 : Clonage d'une portion d'AtFuT1 dans le vecteur pVT-Bac-His. Exemple avec AtFuT1 <sub>Δ68</sub> . ....        | 180 |
| Figure VIII.4 : Recombinaison du plasmide vecteur pVT-Bac-His dans le génome de baculogold.....                              | 181 |
| Figure VIII.5 : Expression de la construction His - AtFuT1 <sub>Δ68</sub> en cellule d'insecte. ....                         | 182 |
| Figure VIII.6 : Principe d'un montage de détection par SPR.....                                                              | 192 |

|                                                                                                                       |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figure VIII.7 : couplage d'un montage fluidique et optique pour mesurer des interactions entre composés par SPRI..... | 193 |
| Figure VIII.8 : un cycle d'injection et d'interaction suivi par un biosenseur optique. ....                           | 194 |
| Figure VIII.9 : Diagramme de phase de cristallisation.....                                                            | 196 |
| Figure VIII.10 : technique de diffusion de vapeur par « hanging drop ». ....                                          | 198 |
| Figure VIII.11 : Les étapes de cristallisation par la technique de diffusion de vapeur....                            | 198 |

---

## **LISTE DES TABLEAUX**

---



---

# LISTE DES TABLEAUX

---

|                                                                                                                                                                                               |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tableau I.1 : Structures de glycosyltransférases produites en système eucaryote pour leur cristallisation.....                                                                                | 42  |
| Tableau II.1 : tampons utilisés pour la lyse des culots bactériens. ....                                                                                                                      | 82  |
| Tableau II.2 : combinaisons de souches et de vecteurs utilisées pour les tests de production et de solubilisation d'AtFuT1 $\Delta$ 68 et AtFuT1 $\Delta$ 93 en <i>Escherichia coli</i> ..... | 85  |
| Tableau II.3 : cycles de passage des cellules cultivées en suspension.....                                                                                                                    | 91  |
| Tableau II.4 : Vitesse de rotation du plateau utilisée en fonction de la taille de l'Erlen. ..                                                                                                | 92  |
| Tableau II.5 : comparatif des différentes méthodes de cultures employées. ....                                                                                                                | 94  |
| Tableau III.1 : conditions employées pour purifier AtFuT1 sur colonne His-Trap FF .....                                                                                                       | 98  |
| Tableau III.2 : comparaison des rendements des différentes purifications réalisées sur colonne His-Trap FF .....                                                                              | 98  |
| Tableau IV.1 : comparaison des valeurs de Km et Vmax obtenues à celles de la littérature .....                                                                                                | 118 |
| Tableau IV.2 : pourcentage d'activité fucosyltransférase d'AtFuT1 avec différents accepteurs .....                                                                                            | 120 |
| Tableau V.1 : Test de dosage à la malachite, concentration des réactifs .....                                                                                                                 | 137 |
| Tableau V.2 : conditions employées lors des tests d'interactions sur les biopuces à oligosaccharides .....                                                                                    | 142 |
| Tableau V.3 : Quelques élément de comparaison entre technique à base de radioactivité, malachite et luminescence.....                                                                         | 146 |
| Tableau V.4 : possibilité de mise en œuvre de chaque technique disponible au laboratoire .....                                                                                                | 147 |
| Tableau VI.1 : conditions induisant la formation de cristaux avec le kit « clear strategy Screen I MD-1-14 » .....                                                                            | 151 |

Tableau VI.2 : les dimensions des deux mailles cristallines régulièrement mesurées : .154

Tableau VI.3 : Criblage de composés à pouvoir phasant. ....155

---

## **LISTE DES ABBREVIATIONS**

---



---

# LISTE DES ABBREVIATIONS

---

**Ac** : anticorps

**amp** : ampicilline

**AtFuT1** : *Arabidopsis thaliana* Galactoside 2- $\alpha$ -L-fucosyltransférase

**ATP** : adénosine triphosphate

**cam** : chloramphénicol

**CAZy** : *carbohydrate active enzyme database*

**CERMAV** : centre de recherche sur les macromolécules végétales

**CHO** : *chinese hamster ovary*

**cryo** : cryoconservation

**Da** : Dalton

**DLS** : *Dynamic light scattering*

**ENTPD3** : ectonucléoside triphosphate diphosphohydrolase 3

**Fuc** : fucose

**FucT** : fucosyltransférase

**FUT8** :  $\alpha$ 1,6-fucosyltransférase

**Gal** : galactose

**GDP** : guanosine diphosphate

**GDP-Fuc** : guanosine diphosphate - fucose

**GT** : Glycosyltransférase

**HEK** : *human embryonic kidney*

**HPLC** : *high performance liquid chromatography*

**IMAC** : *immobilized-metal affinity chromatography*

**IPTG** : Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside

**ISM** : imagerie par spectrométrie de masse

**ITC** : *isothermal titration calorimetry*

**Kan** : kanamycine

**Kd** : constante de dissociation

**Km** : constante de Michaëlis

**MAD** : *multiwavelength anomalous diffraction*

**MALDI** : *matrix-assisted laser desorption/Ionisation*

**Mc/ml** : million de cellule par millilitre

**MOI** : *multiplicity of infection*

**MWCO** : *molecular weight cut off*

**NDP** : nucléoside diphosphate

**Nod** : nodulation

**NodZ** : fucosyltransférase du facteur Nod

**PCR** : *polymerase chain reaction*

**Pd** : polydispersité

**PDB** : *protein data bank*

**PEG** : poly éthylène glycol

**pfu** : *plaque-forming unit*

**pH** : pouvoir Hydrogène

**PNGase** : peptide -N-Glycosidase

**POFUT1** : GDP-fucose protéine o-fucosyltransferase 1

**POFUT2** : GDP-fucose protéine o-fucosyltransferase 2

**PsFuT1** : *Pisum sativum* fucosyltransférase 1

**PVDF** : Polyfluorure de vinylidène

**RG-I** : rhamnogalacturonane I

**RG-II** : rhamnogalacturonane II

**SDS** : *sodium dodecyl sulfate*

**SDS-PAGE** : *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

**SPR** : *surface plasmon resonance*

**tet** : tétracycline

**TMB** : 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine

**TOF** : *time-of-flight*

**tpm** : tour par minute

**Trx** : thiorédoxine

**UDP** : uridine diphosphate

**UGT** : UDP-glycosyltransférase

**Vmax** : vitesse maximale

**xyg** : xyloglucane

**xygo** : oligosaccharide issus de xyloglucane



---

# INTRODUCTION

---



# I. Introduction

## I.1. Les glycosyltransférases

### I.1.1. Définition

Les glycosyltransférases (GTs) sont une large classe d'enzymes qui catalysent la formation d'une liaison glycosidique par le transfert d'un mono – ou oligosaccharide – à partir d'un donneur, généralement un nucléotide sucre, sur un accepteur ([Figure I.1](#)). Les donneurs sont qualifiés « d'activés » car ils comportent un groupement phosphate libéré par la réaction. Il s'agit le plus souvent de nucléotides diphosphates (ex : UDP-Galactose, GDP-Mannose) mais il peut s'agir aussi de nucléotide monophosphate (ex : CMP-NeuAc), ou de lipide phosphate (ex : dolichol-phosphate). Environ 90 % des GTs utilisent des donneurs de type nucléotides sucres. Ces dernières sont souvent appelées les « enzymes Leloir », en référence à Luis F. Leloir, qui découvrit les nucléotides sucres (Leloir, 1964). L'accepteur peut être typiquement un autre saccharide, un lipide, une protéine, ou une petite molécule telle qu'un métabolite secondaire chez la plante, ou un antibiotique. Ces enzymes produisent les oligo- et polysaccharides du vivant, ainsi que tous les autres glycoconjugués.

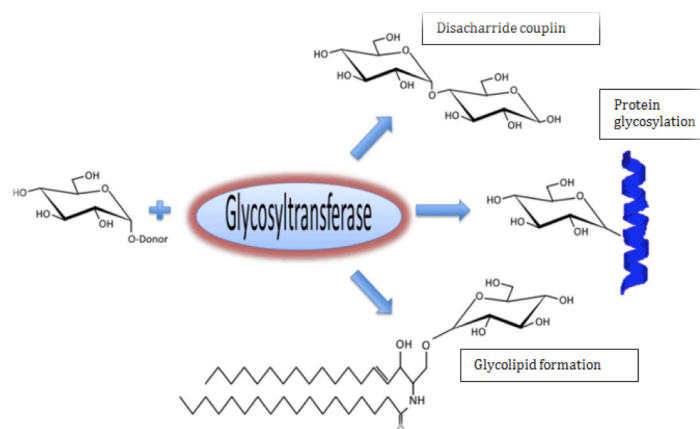


Figure I.1 Principe d'une réaction glycosyltransférase catalysée par un GT

Les glycosyltransférases catalysent le transfert d'une monosaccharide (ici un glucose) depuis un donneur activé sur un substrat accepteur. (entreprise SBH science).

Il est estimé que plus de la moitié des protéines eucaryotes sont glycosylées (Apweiler, Hermjakob, & Sharon, 1999) et que 1 à 2 % du génome de chaque organisme code pour des

GTs (Lairson et al., 2008). L'omniprésence des composés glycosylés dans tous les organismes témoigne du rôle fondamental des GTs pour de nombreux processus biologiques. Les glycannes jouent un rôle fondamental dans les interactions cellule-cellule, cellule-matrice et avec les pathogènes. Cela influence des processus tels que l'embryogénèse, la croissance, le développement de l'organisme, les infections, l'évolution de tumeurs, la signalisation, et de nombreux dysfonctionnements métaboliques (Varki and Lowe 2009). Une glycosylation anormale à la surface des cellules est un moyen de détecter de nombreux cancers. De manière générale, des défauts dans la machinerie de synthèse des glycannes induisent des conséquences désastreuses pour l'organisme (Adamczyk,; Brooks et al., 2008 ; Kranz et al., 2007; Tharmalingam, & Rudd, 2012).

Toutes les enzymes Leloir qui transfèrent le même sucre utilisent le même donneur. Par exemple, toutes les galactosyltransférases utilisent de l'UDP-Gal. En revanche, leurs spécificités vis-à-vis de l'accepteur peuvent varier. L'élément déterminant de cette spécificité est la topologie du site actif au sein de l'enzyme. Leur localisation appropriée dans les compartiments cellulaires, chez les eucaryotes, contribue aussi à la spécificité des réactions. La majorité des GTs sont des protéines membranaires localisées dans le réticulum endoplasmique ou dans l'appareil de Golgi. La [figure 1.2](#) représente un exemple classique de GT golgienne avec une topologie membranaire de type 2.

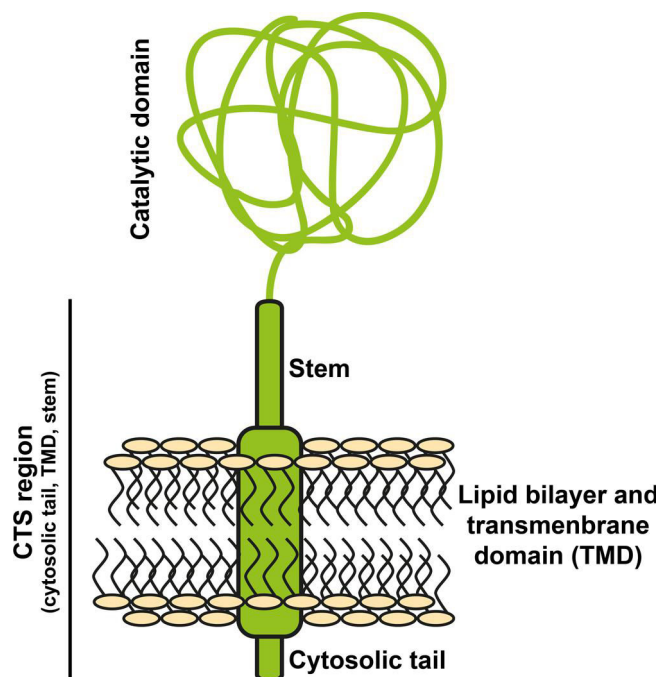


Figure 1.2 : Représentation schématique d'une glycosyltransférase.

Les glycosyltransférases situées dans le Golgi sont principalement des protéines de type II. Leur localisation dans le Golgi dépend de leur partie N-terminale, constituée d'une queue cytosolique, d'un domaine transmembranaire et d'une tige. Loos, Steinkellner, 2014. DOI : <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2014.00523>

Les GTs ajoutent les monosaccharides de manière séquentielle sur les glycanes des glycoconjugués (glycoprotéines, glycolipides,...), ou de façon processive dans le cas des polysaccharides (ex : cellulose).

## I.1.2. Classification des GTs

Les glycosyltransférases sont classées dans une base de données regroupant l'ensemble des enzymes interagissant avec les carbohydrates : the Carbohydrate Active EnZyme Database (Cantarel et al., 2009) (CAZy ; <http://www.cazy.org/>). Cette classification regroupe par famille des gènes codant pour des activités GT (prédites ou démontrées), en fonction de similarités de séquences en acides aminés. A chaque fois qu'une nouvelle activité GT est démontrée pour une séquence encore non classée, une nouvelle famille est créée avec, *de facto*, une nouvelle série de gènes candidats. Les mécanismes d'action et les structures sont généralement similaires au sein d'une même famille. Cette base de données est donc un outil prédictif puissant, qui s'enrichit au fil des nouvelles caractérisations biochimiques et des nouveaux génomes séquencés. Cependant, au sein des familles où plusieurs fonctions ont été assignées, il n'y a pas de corrélation évidente entre une similitude de séquence et la spécificité pour le donneur/accepteur. La spécificité d'une GT de fonction inconnue ne peut donc pas être prédite avec confiance sur la base des homologues de séquence et nécessite d'être expérimentalement démontrée. L'un des exemples les plus évocateurs est la biosynthèse des groupes d'antigènes ABO chez l'humain. Structuellement, le groupe A et le groupe B ne diffèrent que d'un seul sucre : (A : N-acétyl-D-galactosamine ; B : D-galactose). Ces sucres sont ajoutés à l'antigène commun H par la BGA (*blood group synthase A*) ou la BGB (*blood group synthase B*). Ces deux enzymes sont très similaires (elles ne diffèrent que de quatre acides aminés sur un total d'environ 350), mais elles catalysent deux réactions différentes.

Deux configurations stéréochimiques sont possibles pour la liaison glycosidique nouvellement formée. La configuration anomérique du produit peut soit être maintenue, soit être inversée, au regard du substrat donneur. Les GTs sont ainsi classées sur la base de cette caractéristique et dites soit « inverting » (inversion de la configuration anomérique) ou « retaining » (rétention de la configuration anomérique) en fonction du résultat de la réaction (Figure I.3). Cet aspect stéréochimique résulte d'un mécanisme d'action distinct entre les deux cas.

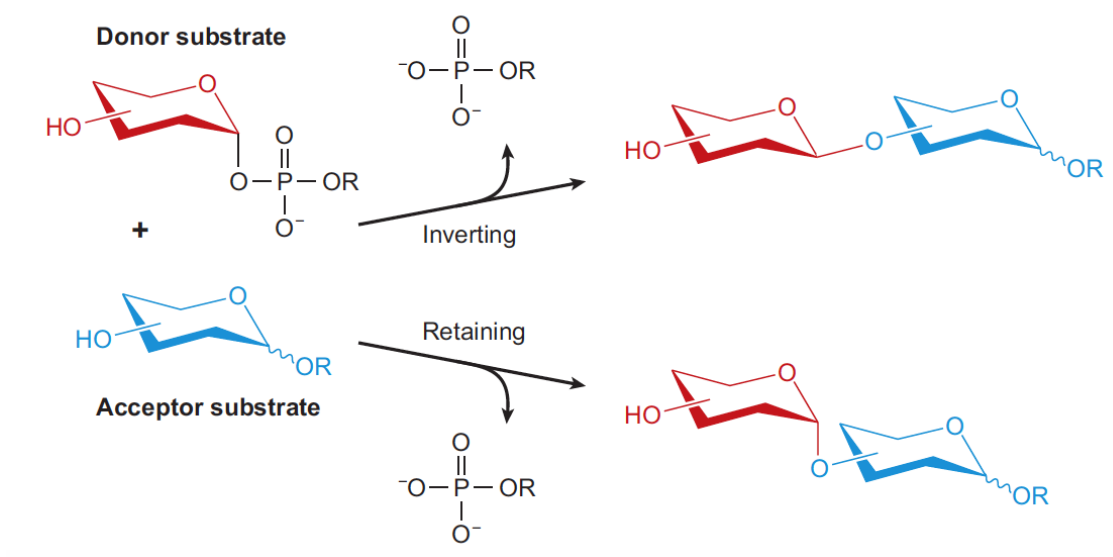


Figure I.3 : Inversion et conservation de l'anométrie du groupement transféré par une GT

Les glycosyltransférases catalysent le transfert d'un glucide sur un accepteur avec soit une inversion soit une rétention de la stéréochimie, par rapport au groupement donneur. (Lairson, 2008, DOI : 10.1146/annurev.biochem.76.061005.092322)

### I.1.3. Structures et mécanismes réactionnels

Les glycosyltransférases présentent à la fois une très grande diversité de séquences et une impressionnante similarité de structures au niveau de leurs domaines catalytiques. A ce jour, toutes les GTs de type Leloir adoptent l'une des deux formes prédominantes de repliements, nommées GT-A et GT-B (Figure I.4) (Breton, Snajdrová, Jeanneau, Koca, & Imberty, 2006). Ces deux repliements se caractérisent par la présence d'au moins un domaine de type Rossmann. Ce domaine peut être décrit comme un sandwich  $\alpha/\beta/\alpha$  composé d'un feuillet  $\beta$  central flanqué de part et d'autre par des hélices  $\alpha$ . Pour les GTs de type GT-A, il est localisé dans la partie N-terminale du domaine catalytique et correspond au domaine de liaison au nucléotide (NBD, *nucleotide binding domain*). Le NBD est généralement accolé à un autre feuillet plus petit et plus variable dont l'association des deux crée le site actif de l'enzyme. Ce second domaine en position C-terminale interagit principalement avec l'accepteur (ABD, *acceptor binding domain*). La très grande majorité des enzymes GT-A possède la signature classique des GTs nécessitant la présence de cations divalents ( $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,...) pour leur activité. Il s'agit du motif DxX (Asp-X-Asp) qui intervient dans la liaison au groupement di-phosphate du nucléotide par l'intermédiaire de ce cation (Breton & Imberty, 1999 ; Breton, Snajdrová, et al., 2006).

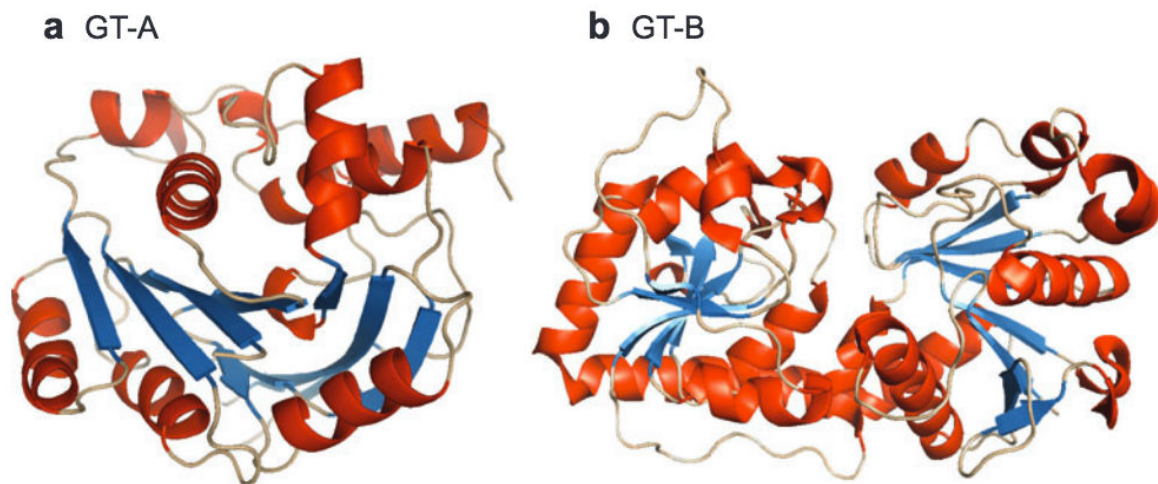


Figure I.4 : Les deux grands types de repliements observés chez les glycosyltransférases.

(a) Le repliement GT-A, représenté par l'enzyme SpsA de *Bacillus subtilis*, Protein Data Bank (pdb) 1qgq, et (b) le repliement GT-B, représenté par le bactériophage T4  $\beta$ -glucosyltransférase, pdb 1jg7. Lairson, *et al* 2008, DOI : 10.1146/annurev.biochem.76.061005.092322.

Les GTs qui adoptent le repliement de type GT-B se présentent généralement sous la forme de 2 domaines de type Rossmann séparés, à l'interface desquels se trouve le site actif (Figure I.4). Le domaine N-terminal est dédié à la reconnaissance de l'accepteur (ABD) et le domaine C-terminal à celui du donneur (NBD). Concernant les enzymes de type GT-B, aucune à ce jour ne s'est révélée être dépendante de cations divalents pour la réaction de transfert. D'autres types de repliements ont été décrits pour les GTs, mais pour des enzymes utilisant des lipide-P-sucre comme donneurs activés (ex : familles CAZy GT51, GT66) (Breton, Fournel-Gigleux, & Palcic, 2012). Le point commun observé pour de nombreuses GTs est la liaison séquentielle de l'enzyme avec ses substrats, avec formation d'un complexe ternaire, qui s'accompagne d'importantes modifications conformationnelles permettant une orientation optimale des substrats pour la réaction de transfert du monosaccharide. Un exemple de flexibilité conformationnelle est donné dans la figure I.5, pour lequel il y a une fixation ordonnée des substrats (UDP-Gal se fixe en premier).

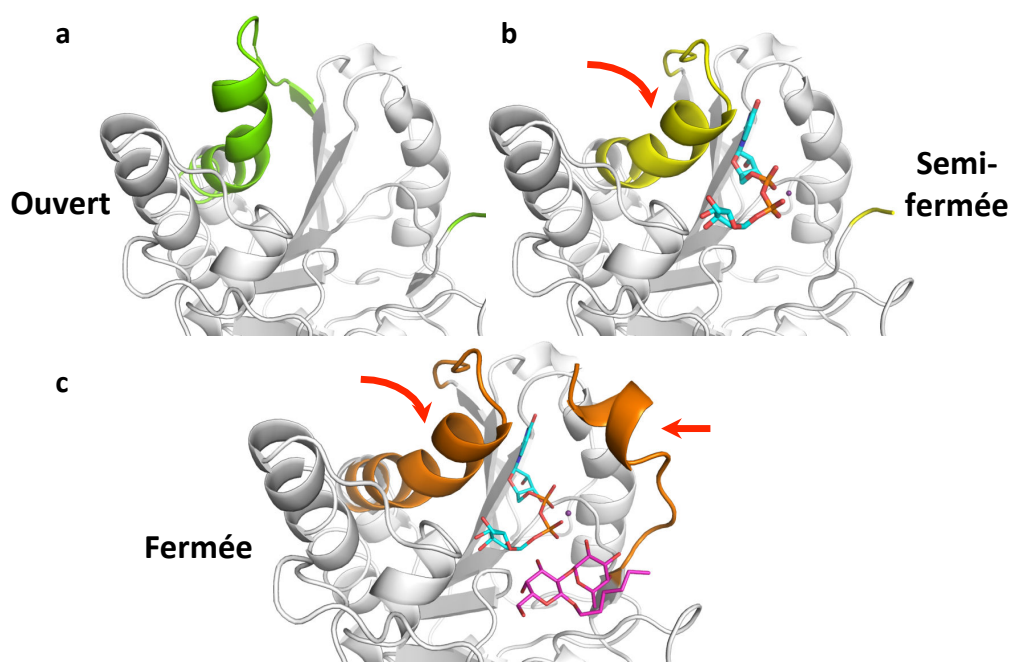


Figure 1.5 : Flexibilité conformationnelle des glycosyltransférases.

Les GTs subissent d'importants changements de conformation lors du cycle catalytique. Image de l' $\alpha$ -1,3-galactosyltransférase du groupe sanguin B humain, en configuration a) libre, ouverte, b) semi-fermée, liée au nucléotide donneur et c) fermée, suite à la liaison de l'accepteur. Thèse de Gaëlle Batot.

Le repliement global de l'enzyme (GT-A ou GT-B) ne dicte pas l'issue stéréochimique de la réaction catalysée : des GT « inverting » et « retaining » ont été identifiées au sein des deux familles structurales. L'observation des acides aminés impliqués dans les interactions avec le donneur et l'accepteur, à partir des structures résolues, a permis d'identifier les mécanismes réactionnels de certaines GTs (Lairson, Henrissat, Davies, & Withers, 2008; Breton et al., 2012). Concernant les enzymes de type « inverting », la réaction la plus souvent évoquée est une substitution nucléophile d'ordre 2 ( $S_N2$ ) au cours de laquelle un acide aminé (Asp, Glu ou His) joue le rôle de base catalytique déprotonant l'accepteur, ce qui rend ce dernier nucléophile et lui permet d'attaquer le donneur. Ce mécanisme s'accompagne de la formation d'un état intermédiaire de type ion oxocarbenium (Figure 1.6). Si ce mécanisme semble être largement répandu et accepté pour les enzymes « inverting », un mécanisme différent a été proposé récemment pour une protéine-O-Fucosyltransférases (POFUT1) de la famille GT65. Pour cette enzyme, qui ne présente pas de base catalytique correctement positionnée pour cette attaque, un mécanisme de type  $S_N1$ -like, dans lequel la liaison glucidique serait clivée avant l'attaque nucléophile par l'accepteur, a été suggéré (Lira-Navarrete et al., 2011). Une arginine très conservée dans cette famille de GT (Martinez-Duncker, 2003) serait le résidu clé qui faciliterait le clivage de la liaison osidique.

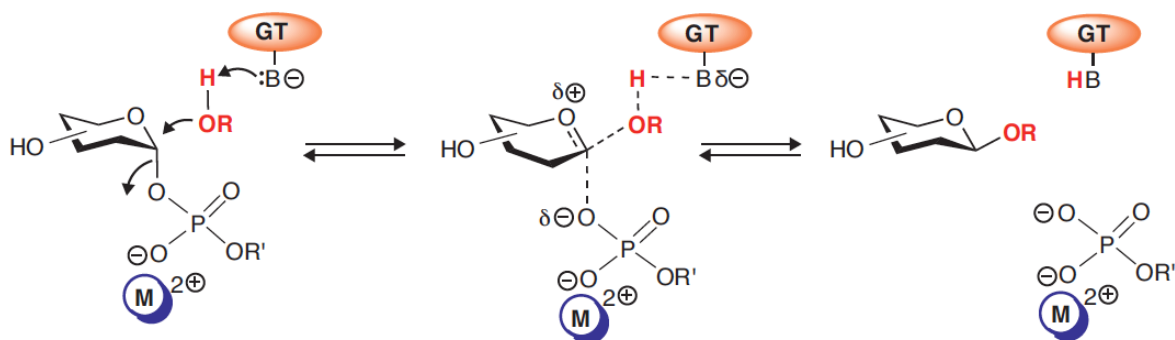


Figure 1.6 : Schéma représentant un mécanisme d'action d'une GT-A "inverting".

Un acide aminé nucléophile sert à déprotoner le groupement OH de l'accepteur (HOR, en rouge) et la charge négative se développant sur le groupement phosphate peut être stabilisée par exemple par un cation (pour une GT-A) ou par des résidus basiques (pour une GT-B). Lairson *et al*, 2008. DOI : 10.1146/annurev.biochem.76.061005.092322.

Le mécanisme des enzymes « retaining » est encore sujet à controverse (Breton *et al*, 2012). Deux mécanismes différents ont été proposés : (a) un double déplacement de type  $S_N2$  et (b) un mécanisme proche de la substitution nucléophile interne ( $S_{Ni}$ -like). Dans le cas du double déplacement, une première attaque nucléophile par un résidu catalytique de l'enzyme sur le centre anomérique du substrat donneur conduit à la formation d'un intermédiaire covalent glycosyl-enzyme avec une première inversion de la configuration anomérique. Dans un second temps, cet intermédiaire est attaqué par le groupement hydroxyle de l'accepteur, après sa déprotonation par une base catalytique (ou par le groupement phosphate partant). La configuration, inversée une deuxième fois, se retrouve identique à l'initiale. Le mécanisme du type  $S_{Ni}$  (pour *internal return*) est considéré comme le plus fréquent. Il a été proposé suite à l'observation de l'absence de résidu positionné de manière à former un intermédiaire glycosyl-enzyme dans certains sites actifs de GT « retaining » (Lairson *et al*, 2008). Ce mécanisme implique une attaque nucléophile et le départ du groupement phosphate de façon concertée mais asynchrone sur la même face du sucre.

L'absence de résidus nucléophiles favorablement positionnés pour induire un double déplacement favorise indirectement le mécanisme type  $S_{Ni}$  (Chang, Singh, Phillips, & Thorson, 2011). Cependant, des données expérimentales ont été obtenues supportant chacun des mécanismes proposés (Monegal & Planas, 2006 ; Errey *et al*, 2010 ; Ardèvol & Rovira, 2011 ). Il est donc tout à fait possible que les GTs utilisent différents mécanismes réactionnels. Ceci démontre la nécessité de davantage d'études structurales et de résolution de structures pour améliorer la compréhension des mécanismes d'action de cette classe d'enzymes.

## I.2. Caractérisation biochimique et structurale des GTs

### I.2.1. La recherche d'activité GTs

Bien que les analyses génomiques permettent d'identifier des GTs potentielles, il est presque impossible de prédire quel monosaccharide peut être transféré et sur quel(s) accepteur(s). Les tests *in vitro* sont alors le moyen ultime et indispensable pour déterminer une activité de transfert. Cependant, ils sont aussi souvent l'étape la plus difficile du processus de caractérisation. Le défaut de prédiction bio-informatique implique souvent de cribler un grand nombre de combinaisons de donneurs, de structures d'accepteurs et de tampons avant d'identifier les substrats appropriés d'une enzyme donnée. En plus du défi principal d'identifier une nouvelle GT, il est nécessaire par la suite de pouvoir apprécier son niveau d'activité dans différentes conditions, ou pour divers mutants. Ces tests se font typiquement dans le cadre d'ingénierie enzymatique, de criblage de substrats analogues, ou de suivi de purification. Le format de test le plus approprié dépend donc des besoins spécifiques de chaque projet. Le nombre de combinaisons donneur-accepteur à tester, la sensibilité, la gamme de réponse, ainsi que la possibilité de travailler avec des extraits cellulaires bruts sont les éléments principaux à considérer pour choisir l'approche. Ensuite viennent évidemment les aspects pratiques, tels que la complexité et l'accessibilité de la technologie à mettre en œuvre, le coût des tests, leur fiabilité et leur reproductibilité. Les diverses méthodes développées pour caractériser et quantifier des activités GTs impliquent la majorité des techniques des sciences analytiques : radiochimie, immunologie, chromatographie, spectrométrie de masse, spectrophotométrie, bio-luminescence,... . Avoir un aperçu des avantages et limitations de chacune de ces méthodes permet de déterminer lesquelles sont les plus appropriées pour une problématique et un environnement de recherche donné. Un certain nombre de revues ont été publiées sur ce sujet et je tenterai dans ce qui suit de présenter un aperçu (non exhaustif) des différentes techniques pouvant être utilisées pour le dosage d'activités GTs (Wagner & Pesnot, 2010 ; H. S. Lee & Thorson, 2011 ; de Rond, Danielewicz, & Northen, 2014).

#### ➤ Les méthodes radiochimiques

Il s'agit là des méthodes qui ont été les plus communément utilisées en laboratoire. Le principe consiste à utiliser un nucléotide-sucré dont le résidu de sucre est marqué par un atome radioactif, généralement du carbone 14. Ce résidu marqué, une fois transféré, est lié à l'accepteur. Les nucléotides sucre marqués restant sont alors retirés du mélange

réactionnel et la quantification du nombre de réactions se fait par comptage des scintillations, issues de l'accepteur nouvellement marqué. Les avantages à l'utilisation de la radioactivité sont la très grande sensibilité, ce qui permet de travailler avec très peu d'enzyme, et la spécificité de la mesure. Seul l'isotope radio-marqué est quantifié, directement, par le détecteur. Aucun autre composé n'interfère significativement avec le système de mesure. Cela permet de mettre en évidence des activités de transfert y compris sur des extraits cellulaires brut. Les applications sont par contre limitées par le coût et la difficulté à se procurer des donneurs radio-marqués dont certains, notamment de plantes et de bactéries, ne sont pas disponibles commercialement. La mise en œuvre est aussi compliquée, puisque les tests doivent être effectués par un personnel spécialement formé, dans une salle dédiée. De plus, les inconvénients majeurs dus à l'utilisation de matériel radioactif et des déchets générés, et la volonté de la part des instituts de fermer les salles de radioactivité incitent à s'orienter vers d'autres systèmes de détection.

### ➤ **Les techniques de chromatographie**

Les principales techniques de chromatographies utilisées sont l'HPLC, l'électrophorèse capillaire et la chromatographie échangeuse d'ion,... La propriété d'absorption dans l'UV des bases nucléotidiques permet par exemple de suivre par HPLC soit la disparition du nucléotide-sucré, soit l'apparition du nucléotide. Des donneurs analogues avec un résidu de sucre plus réactif aux UV ou fluorescents ont été développés pour suivre directement la formation du produit de la réaction. Cela augmente la sensibilité et permet de travailler avec des extraits bruts (Hayashi, Horibata, Sakaguchi, Okino, & Ito, 2005).

### ➤ **Les tests basés sur la fluorescence**

Plusieurs méthodes de fluorescence, non couplées à des étapes préliminaires de chromatographies, sont couramment utilisées pour le dosage de GTs. Les principaux avantages généralement attribués à ces techniques sont leur sensibilité, leur simplicité de mise en œuvre et la possibilité de faire évoluer les protocoles vers une approche à haut débit. Plusieurs méthodes permettent par exemple d'induire une fluorescence à partir du nucléotide di-phosphate (NDP), produit par la réaction GT ([Figure 1.7](#)).

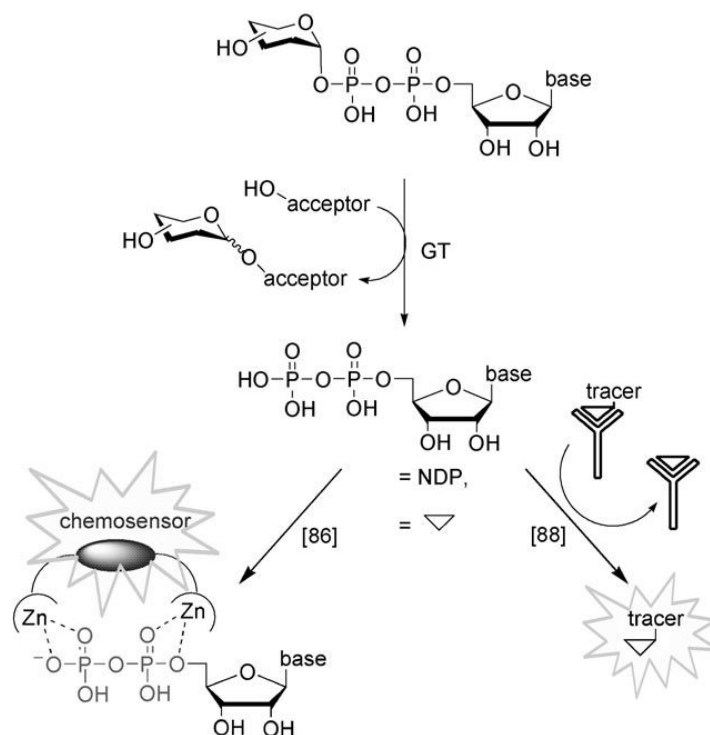


Figure I.7 : Exemple de test de détection d'activité GT basé sur la fluorescence.

Utilisation d'un chemosenseur (gauche) ou d'une immunodétection (droite) pour suivre la formation de nucléotide diphosphate (NDP), co-produit de la réaction GT. Wagner et Pesnot, 2010. DOI: 10.1002/cbic.201000201

La plus citée et la plus généralisable est probablement celle développée initialement par l'équipe de Hamachi. Leur système est basé sur l'interaction du xanthène, un chemosenseur, avec les phosphates du NDP par l'intermédiaire de zinc. Cela leur a permis de mettre en place un criblage efficace d'inhibiteurs de l'enzyme étudiée (Wongkongkatep, Miyahara, Ojida, & Hamachi, 2006). D'autres tests utilisant une approche similaire ont depuis été développés (Chung, Nam, Lim, Park, & Yoon, 2009). Plus récemment, le groupe de Nagano a développé un système lui aussi basé sur la détection du NDP, mais après deux étapes enzymatiques. Les nucléotides di-phosphates sont d'abord phosphorylés par une nucléotide kinase, à partir d'ATP présent en excès. Puis, l'ADP produit issu de cette réaction est utilisé par deux autres enzymes qui convertissent la resazurine en resorufine, fortement fluorescente (Kumagai, Kojima, Okabe, & Nagano, 2014). Ce test, sensible et adaptable au criblage à haut débit, est utilisable avec la majorité des donneurs activés : ceux dont les bases sont la guanine, l'uridine ou la cytosine.

Un test basé sur l'utilisation d'anticorps (Ac) marqués par un fluorochrome est commercialisé sous le nom de « transcreener » (BellBrook labs). La liaison Ac-NDP modifie

la polarisation de la lumière réémise par la sonde et cette propriété est utilisée pour la détection. Bien qu'aussi applicable à l'étude de nombreuses GT, la précision de ce test dépend de la spécificité de l'anticorps utilisé pour le NDP d'intérêt. Le coût relatif à l'utilisation de sondes complexes est aussi une limitation au développement de tests à haut débit. Un autre système consiste à coupler l'un des substrats à une sonde fluorescente et à trier les cellules dans lesquelles l'activité de transfert se fait. Le groupe de Withers a ainsi couplé l'accepteur d'une sialyltransférase (ST) à un fluorochrome classique. Une banque de plus d'un million de mutants du gène d'intérêt a été créée par PCR à erreur (*error-prone* PCR) et le criblage a été effectué directement sur les bactéries transformées, à l'aide de la technique du FACS (*fluorescence-activated cell sorting*). Ils ont ainsi pu sélectionner un mutant codant une enzyme 400 fois plus active que la « sauvage » (Aharoni et al., 2006). Il s'agit *a priori* du seul test, à l'heure actuelle, à permettre d'effectuer des criblages à haut débit d'activité GT *in cellulo*. Ces techniques extrêmement puissantes nécessitent toutefois d'avoir préalablement couplé le donneur ou l'accepteur à une molécule fluorescente. Cet investissement peut s'avérer très intéressant dans le cadre de l'ingénierie d'une enzyme dont l'intérêt médical ou industriel est clairement identifié. En revanche, il s'agit d'un format compliqué à développer dans le cadre de criblage d'activité. De plus, les modifications de structure effectuées sur les substrats peuvent nuire à l'activité de certaines enzymes.

### ➤ Les tests colorimétriques

Les deux principaux tests colorimétriques disponibles sont basés sur des réactions chimiques impliquant des co-produits de réactions communs à presque toutes les GTs. Il s'agit d'un avantage important, étant donné la très grande diversité de substrats de famille d'enzyme. L'absence de sonde pour ce type de tests et la lecture du résultat par de simples spectrophotomètres diminuent les coûts et facilitent le criblage d'un grand nombre de conditions. La première méthode exploite la modification du pH induite par la réaction d'une GT, qui libère un proton. Deng et Chen ont par exemple utilisé le rouge de phénol pour caractériser ce changement de pH (Deng & Chen, 2004). Cela leur a permis d'identifier les substrats de trois galactosyltransférases. Persson et Palcic ont ensuite développé un test similaire, basé cette fois sur le bleu de bromothymol pour la révélation. Cet indicateur de changement de pH leur a permis de cribler une banque de 350 mutants et d'en identifier deux dont l'activité est le double de l'enzyme sauvage (Persson & Palcic, 2008). Toutefois, ces tests ne peuvent être utilisés qu'avec des enzymes purifiées et au sein d'une gamme très restreinte de pH.

Le deuxième test colorimétrique implique l'utilisation d'une nucléotidase pour cliver la liaison di-phosphate des NDP générés suite au transfert de sucre (Figure I.8). Les groupes phosphates (Pi) libérés réagissent ensuite avec un réactif à base de malachite, ce qui crée

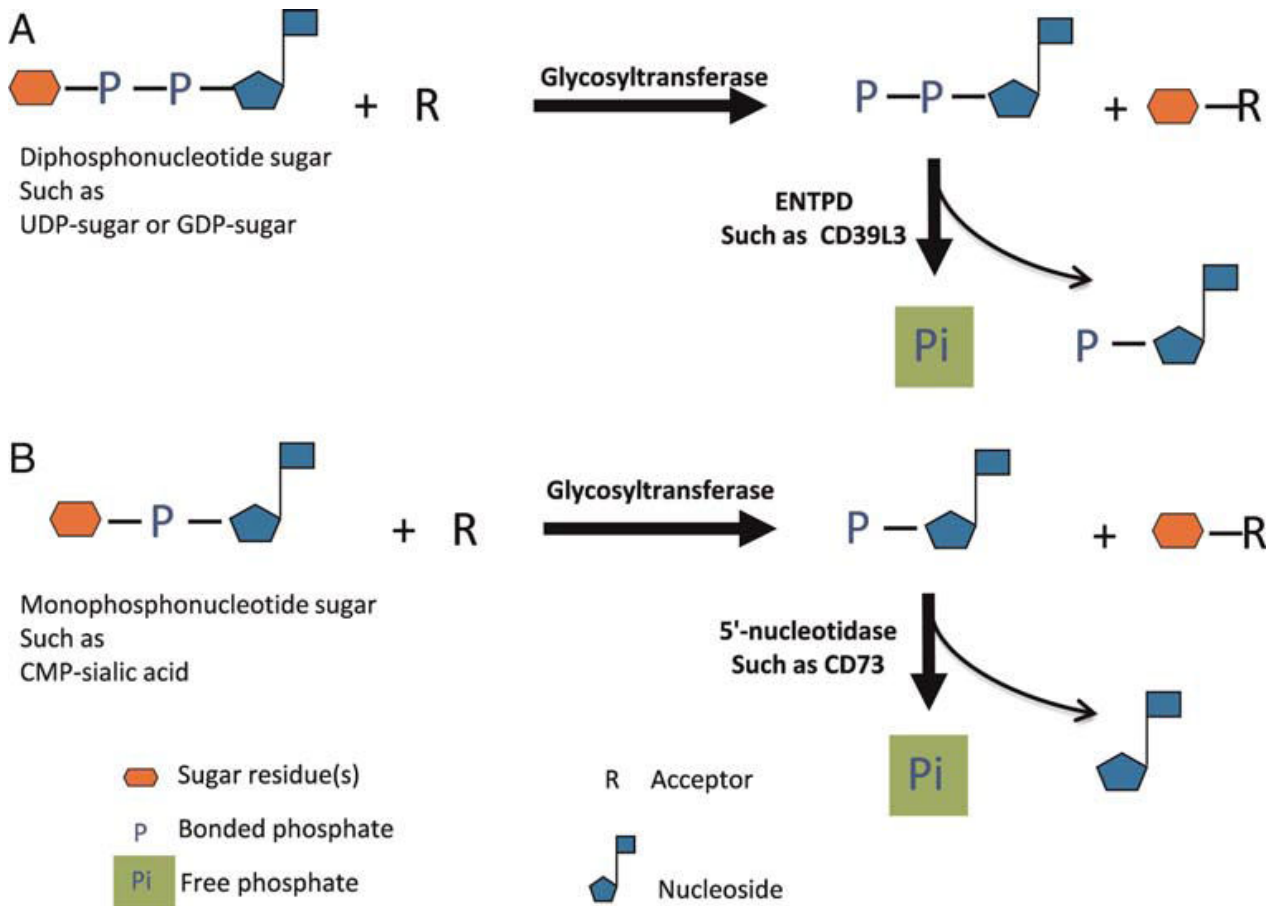


Figure I.8 : Test d'activité GT par détection du phosphate.

La réaction GT est couplée à l'action d'une nucléotidase. Sur le schéma, une ENTPD / CD39L3 et une CD73 possèdent pour substrat un nucléotide di-phosphate et un nucléotide monophosphate, respectivement. Le phosphate inorganique est alors détecté par un réactif chimique. La quantité de produit formé est dosée par colorimétrie (Wu, 2011. DOI : 10.1093/glycob/cwq187)

un complexe coloré mesurable aux alentours de 600 nm (Pegan, Tian, Sershon, & Mesecar, 2010 ; Wu, Ethen, Prather, MacHacek, & Jiang, 2011). Un kit contenant l'ensemble des réactifs est commercialisé par la société « Bio-Techne ». Cette méthode est adaptable au criblage d'activité à haut débit. Cependant, même si le seuil de détection, de l'ordre du  $\mu\text{M}$ , est acceptable pour un test d'activité, la gamme linéaire de réponse est assez restreinte. De plus, l'utilisation d'une nucléase/phosphatase suivie de la réaction avec la malachite implique que tous les nucléotides-sucres et tous les ions phosphates sont dosés. Le bruit de fond est donc souvent élevé et ce test ne peut être utilisé qu'avec une enzyme purifiée.

## ➤ Les tests par bioluminescence

Basés aussi sur la détection des nucléotides issus de la réaction GT, ces tests ont l'avantage d'être plus spécifiques et plus robustes que les tests colorimétriques. Le principe consiste à utiliser une enzyme capable de synthétiser de l'ATP à partir du NDP libéré par la réaction GT. Cet ATP est ensuite utilisé par une luciférase, qui produit de la bioluminescence mesurée par un luminomètre. Puisque seul le nucléotide d'intérêt est dosé, le bruit de fond diminue considérablement par rapport à une révélation basée sur le pH ou la détection de phosphate. Ce test est disponible commercialement pour les nucléotides de type UDP et depuis peu pour ceux de type GDP. Il est utilisable pour du haut débit (UDP-Glo, GDP-Glo, Promega). Le luminomètre, utilisé pour la détection, est un appareil (ou un module d'appareil) moins fréquemment utilisé dans les laboratoires que le spectrophotomètre, ce qui peut nécessiter un investissement coûteux pour une application spécifique.

## ➤ La spectrométrie de masse

Beaucoup de techniques très puissantes permettent d'exploiter le principe de spectrométrie de masse pour détecter des activités enzymatiques (de Rond et al., 2014). Les approches les plus courantes consistent à immobiliser les composés à analyser sur un support solide de manière spatialement définie, avant de les passer au spectromètre. Les réactions enzymatiques peuvent soit être effectuées préalablement en solution, soit sur la surface utilisée pour l'analyse après couplage des accepteurs potentiels (Figure I.9).

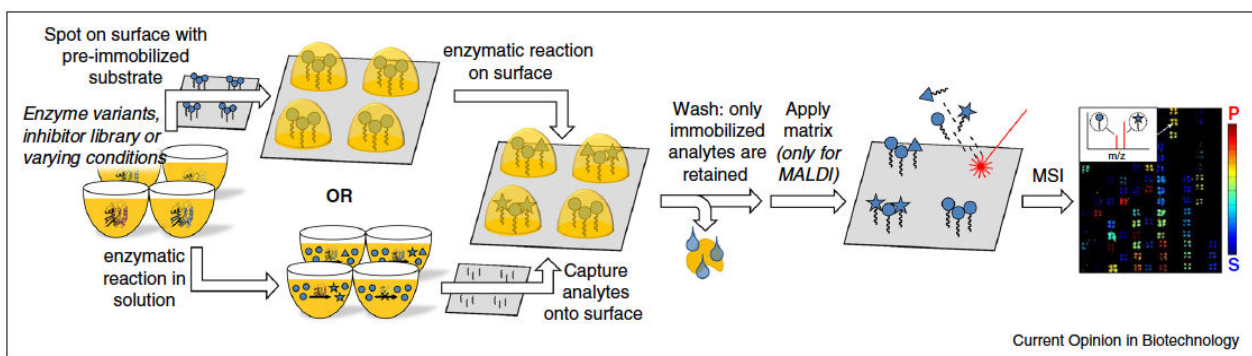


Figure I.9 : Aperçu général de recherche d'activité enzymatique par spectrométrie de masse à imagerie.

Dans un premier temps, les réactions sont effectuées soit avec les substrats à cribler immobilisés sur la plaque, soit en solution. Dans le deuxième cas, les analytes sont ensuite déposés sur la plaque. Cette dernière est alors lavée pour éliminer les débris cellulaires, sels et autres contaminants qui pourraient altérer le signal. Enfin, la surface est analysée par ISM (imagerie par spectrométrie de masse) et les signaux quantifiés pour déterminer le niveau d'activité enzymatique. De Rond, 2015. DOI : 10.1016/j.copbio.2014.07.008

Effectuer les réactions en solution présente l'avantage d'une accessibilité optimale des substrats pour l'enzyme. Cette approche a été utilisée par le groupe de Markus Pauly pour développer une méthode de caractérisation de GT actives sur les polysaccharides (Leboeuf, Immerzeel, Gibon, Steup, & Pauly, 2008). L'inconvénient est de devoir effectuer toutes les réactions avant de placer les mélanges réactionnels sur le support où se fait l'analyse. Lorsque les réactions sont effectuées sur la plaque, il faut en revanche souvent optimiser les étapes de couplage des accepteurs au support. L'exemple le plus notable d'utilisation de cette approche est probablement celui du groupe de Mrksich (*Northwestern University, USA*). Ces auteurs ont couplé différents oligosaccharides sur une monocouche d'alkanethiolates présents sur la surface d'or d'une puce commerciale. Ils ont ensuite testé 85 glycosyltransférases potentielles dans différentes conditions de tampons et pour plusieurs donneurs. Au total, 14 280 réactions ont été criblées et cela a permis d'identifier rapidement quatre nouvelles glycosyltransférases (Ban et al., 2012). Cette technique très puissante nécessite toutefois de longues mises au point et l'accès fréquent à une technologie complexe.

## **I.2.2. Production de GTs eucaryotes pour la cristallisation**

Malgré le fait que les glycosyltransférases sont une classe clé d'enzymes impliquées dans le glycode du vivant, la synthèse, l'activation et la solubilisation de nombreux métabolites, leurs mécanismes d'action sont encore peu compris. Ces enzymes, généralement complexes peuvent s'avérer difficiles à produire actives et solubles de manière recombinante. Cette particularité s'avère d'autant plus contraignante pour des études structurales. La taille de ces protéines, généralement comprise entre 30 et 70 KDa, implique d'utiliser la méthode de diffraction des rayons X et rend difficile l'utilisation de la RMN. La diffraction des rayons X est une technique très puissante, mais avec des contraintes qui s'avèrent être des obstacles majeurs pour l'étude des glycosyltransférases. L'obtention de cristaux implique de disposer de quantités de l'ordre du milligramme d'enzyme soluble, pure et active. De plus, les GTs sont une classe d'enzyme dont les similarités de séquences sont faibles, y compris au sein d'une même famille CAZy. Cela exclut généralement d'extraire et d'utiliser certaines données de diffraction, les phases, des structures déjà résolues. Le phasage expérimental des données de diffraction est par conséquent souvent nécessaire. La capacité du système de production à incorporer de la sélénométhionine dans la protéine doit être prise en compte dès le départ, puisque c'est le moyen le plus sûr de pouvoir résoudre cette difficulté. Choisir le bon système d'expression est donc essentiel, puisque cela affecte la qualité et la quantité de matériel qui sera produit pour la purification et la cristallisation, ainsi que l'étape de phasage expérimental, souvent nécessaire. Les organismes majoritairement utilisés sont les bactéries, la levure, les cellules de mammifère et le système baculovirus-

cellules d'insectes (Petersen et al., 2009 ; Damasceno, Huang, & Batt, 2012 ; S. Xiao, Shiloach, & Betenbaugh, 2014). Le choix se fait idéalement en fonction des caractéristiques prédites de la protéine, et concrètement souvent selon les dispositifs en place dans les laboratoires. Les paragraphes ci-dessous présentent les différents systèmes utilisés pour la production de GTs eucaryotes dont la structure a été résolue. Afin de déterminer quelles GTs et comment elles ont été produites, j'ai criblé le site PDB (Protein Data Bank : <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) avec les filtres suivants : « glycosyltransferase » ou « fucosyltransferase » et « eucaryote ». Je n'ai retenu qu'une seule référence par GT. Parmi les 76 GTs eucaryotes dont la structure est résolue en août 2015, 64 ont été produites en bactéries et 12 en systèmes eucaryotes. Concernant les fucosyltransférases eucaryotes, les 3 identifiées ont toutes été produites en système eucaryote (tableau I.1). Il est intéressant de noter que La seule FucT produite en *E. coli* est issue d'une séquence bactérienne. Il s'agit de celle responsable de la fucosylation du facteur NodZ chez la bactérie *Bradyrhizobium* (Brzezinski, Stepkowski, Panjekar, Bujacz, & Jaskolski, 2007).

### ➤ **Escherichia coli**

Ce système est presque toujours envisagé d'emblée. C'est le plus simple à mettre en œuvre, le plus rapide, le moins coûteux et il permet d'obtenir des quantités importantes de protéines. C'est aussi le système qui permet d'incorporer aux alentours de 100 % de sélénométhionine, alors que ce taux s'avère plus faible et plus variable avec les cellules eucaryotes. A titre illustratif, 88 % des protéines disponibles dans la *Protein Data Bank* (PDB) en 2010 avaient été produites chez *E. coli* (Nettleship, Assenberg, Diprose, Rahman-Huq, & Owens, 2010). Ce chiffre est à peu près similaire pour les structures de GTs eucaryotes observées (64/76). Pourtant, les enzymes eucaryotes nécessitant des modifications post-traductionnelles complexes, notamment la glycosylation, ont peu de chances d'être exprimées sous forme active dans cet organisme. Il arrive aussi qu'elles soient exprimées sous formes de corps d'inclusions, nécessitant alors des étapes de solubilisation et renaturation avec des taux de succès peu garantis (Saribas, Johnson, Liu, Bezila, & Hakes, 2007 ; Hrmova, Stone, & Fincher, 2010). Les organismes eucaryotes majoritairement utilisés pour la production de protéines recombinantes sont la levure *Pichia*, les cellules de mammifère (CHO et HEK), ainsi que les cellules d'insecte.

### ➤ **Les levures**

Les levures (communément *Pichia pastoris*), ont des niveaux d'expression adaptés pour la cristallisation. Les manipulations génétiques sont simples et cet organisme effectue beaucoup de modifications post-traductionnelles eucaryotes, incluant la N-glycosylation (Jacobs, Geysens, Vervecken, Contreras, & Callewaert, 2009). La production de protéines

sélénées est aussi possible, avec un taux d'incorporation généralement d'environ 50 %. Cependant, le caractère « hypermannosylé » des structures de N-glycannes présent sur les protéines produites de façon recombinante chez *Pichia pastoris* pose généralement problème (Figure I.10). Cette hyper-glycosylation est généralement un obstacle majeur à la cristallisation, puisque ces structures flexibles ont tendance à empêcher un agencement répété et ordonné de la protéine, souhaité pour la formation de cristaux. Des études sont menées dans le but de modifier la voie de synthèse des N-glycannes de *P. pastoris*, (Jacobs et al., 2009), et des traitements à l'endoglycosidase H ou F1 permettent de déglycosyler la protéine sécrétée. Trois structures de GTs, toutes impliquées dans la O-glycosylation de protéines eucaryotes, ont été résolues suite à leur production chez *Pichia* (tableau I.1). Deux d'entre elles sont des polypeptide-N-acetylgalactosaminyltransférases impliquées dans la synthèse des mucines de mammifère et la troisième est une fucosyltransférase (POFUT1). POFUT1 est l'une des deux fucosyltransférases connues impliquées dans la O-glycosylation de protéines eucaryotes. La séquence choisie par les auteurs est celle de *Caenorhabditis elegans*, pour son absence de site de N-glycosylation. Cette stratégie a permis d'obtenir l'enzyme active et réussir sa cristallisation (Lira-Navarrete et al., 2011).

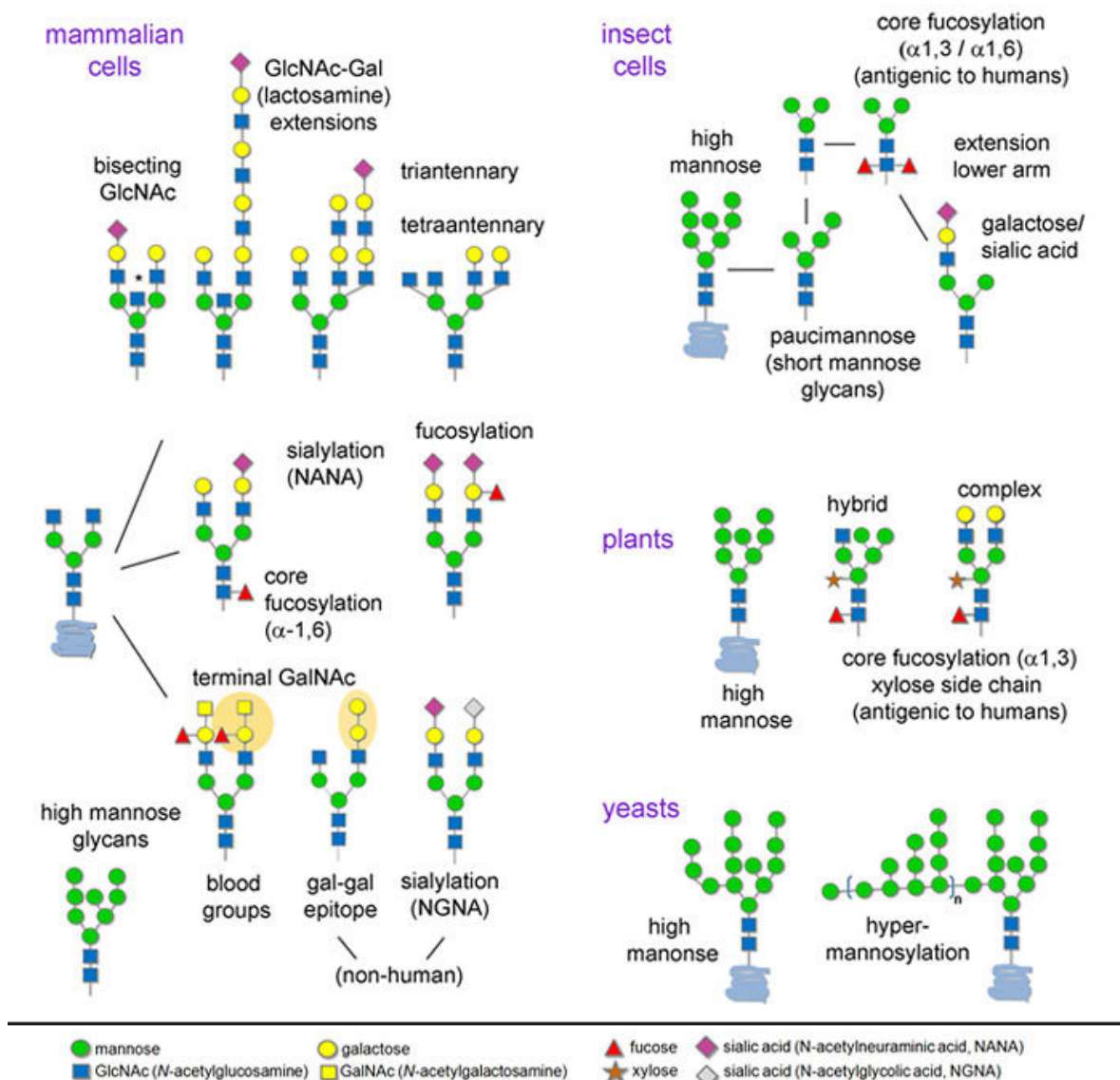


Figure I.10 : N-glycannes de différents organismes couramment utilisés pour produire des protéines recombinantes.

Les structures représentées ne sont pas exhaustives, et le profil de glycosylation effectué par organisme peut aussi être modifié par ingénierie. (NEB).

## ➤ Les cellules de mammifères

Les cellules de mammifère sont couramment utilisées pour produire des glycoprotéines, notamment celles d'origine humaine (S. Xiao, White, Betenbaugh, Grisshammer, & Shiloach, 2013). Ces cellules possèdent la machinerie appropriée pour le repliement et toutes les modifications post-traductionnelles des protéines des eucaryotes supérieurs. En revanche, les niveaux d'expression sont faibles en comparaison des autres systèmes eucaryotes, les

procédures sont longues et les coûts de cultures élevés (S. Xiao et al., 2013). Le marquage à la sélénométhionine est plus difficile qu'en *E. coli*, mais réalisable, avec des taux d'incorporation rapportés de 80 % pour des protéines sécrétées (Nettleship et al., 2010). Les N-glycannes sont complexes, de tailles importantes et hétérogènes (Figure 1.10). De manière à limiter ce handicap pour la cristallisation, des mutants pour certaines GTs de la voie de synthèse des glycannes ou d'inhibiteurs sont parfois utilisés (J. E. Lee, Fusco, & Ollmann Saphire, 2009). La fucosyltransférase POFUT2 est impliquée dans la O-fucosylation des protéines eucaryotes. La POFUT2 humaine, contenant deux ponts di-sulfures et trois sites de N-glycosylation, a pu être produite active en cellules HEK- (Human Embryonic Kidney) et cristallisée (Chen et al., 2012). Les cellules étaient cultivées en adhérence et 200 boîtes étaient utilisées (150 x 15 mm, BD Falcon) par production. Les deux autres GT produites en cellules de mammifères dont la structure est déposée dans la PDB sont des N-acetylglucosaminyltransférase : la  $\beta$ -1,6-N-acetylglucosaminyltransférase (C2GnT-L) et la N-acetylglucosaminyltransférase I (GnT I). La production de cette dernière s'est faite dans des cellules CHO, adaptées à la culture en suspension et cultivées en bioréacteur (Pak, Satkunarajah, Seetharaman, & Rini, 2011).

### ➤ Les cellules d'insectes

Les cellules d'insecte sont capables d'effectuer les repliements et les modifications post traductionnelles complexes des protéines eucaryotes, telle que la N- et O-glycosylation. Les N-glycannes, relativement homogènes et compacts, sont constitués de quelques mannoses parfois fucosylés. Ces courts motifs présentent généralement le double avantage de suffire à rendre la protéine soluble ou active lorsqu'une glycosylation est nécessaire, tout en étant compatible avec la cristallisation. Les étapes entre la génération des plasmides et la première récolte de protéines sont moins nombreuses qu'en cellules humaines HEK et les premières récoltes de protéines s'obtiennent deux fois plus rapidement que dans ce dernier système (S. Xiao et al., 2013). Les cellules d'insectes sont à priori aussi plus productives. Une étude comparative du niveau de production d'une fucosyltransférase humaine exprimée en cellules HEK ou en cellules d'insectes a montré que l'enzyme était entre 4 et 10 fois plus exprimée en cellule d'insectes (Münster, Ziegelmüller, Spillner, & Bredehorst, 2006). En revanche, le marquage des protéines à la sélénométhionine est difficile à réaliser, du fait de la toxicité de cette molécule et du long temps d'incubation induit par l'utilisation de promoteurs tardifs du baculovirus (polyhedrine ou P10) (Nettleship et al., 2010). Les deux seules GT eucaryotes dont les structures ont été résolues après production en cellules d'insecte sont la  $\beta$ 1,3N-acetylglucosaminyltransférase (Fringe) des récepteurs Notch, impliquée dans le développement et la prolifération cellulaire (Jinek, Chen, Clausen, Cohen, & Conti, 2006) et la fucosyltransférase 8 humaine (FuT8) qui ajoute un fucose lié en  $\alpha$ 1-6

sur le résidu GlcNAc proximal des N-glycanes (Ihara.) Cette FuT8 est O-glycosylée et contient des ponts disulfures (Ihara et al., 2007). Les auteurs l'ont produite en cellules Sf9.

Par ailleurs, il est intéressant de noter que seules trois structures de fucosyltransférases eucaryotes sont disponibles dans la PDB, et toutes ont été produites en système eucaryote. La seule FucT produite en *E. coli* est issue d'une séquence bactérienne. Il s'agit de celle responsable de la fucosylation du facteur NodZ chez la bactérie *Bradyrhizobium* (Brzezinski et al., 2007).

Tableau I.1 : Structures de glycosyltransférases produites en système eucaryote pour leur cristallisation.

Les fucosyltransférases sont représentées en rouge. Recherche PDB 1995- avril 2015

| Protéine                                                                      | Organisme           | PDB  | cellules Hôte         | référence                                       |
|-------------------------------------------------------------------------------|---------------------|------|-----------------------|-------------------------------------------------|
| Human-galactoside-2,6-sialyltransferase I                                     | <i>H. sapiens</i>   | 4JS1 | <i>H. sapiens</i> HEK | (Kuhn et al., 2013)                             |
| <b>O-fucosyltransferase 2 (POFUT 2)</b>                                       | <i>H. sapiens</i>   | 4AP5 | <i>H. sapiens</i> HEK | (Chen et al., 2012)                             |
| <b><math>\beta</math>-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase (C2GnT-L)</b>       | <i>M. musculus</i>  | 3OTK | <i>H. sapiens</i> HEK | (Pak et al., 2011)                              |
| <b>O-fucosyltransferase 1 (POFUT 1)</b>                                       | <i>C. elegans</i>   | 3ZY3 | <i>P. pastoris</i>    | (Lira-Navarrete et al., 2011)                   |
| <b><math>\alpha</math>1,6-fucosyltransferase (FUT8)</b>                       | <i>H. sapiens</i>   | 2DE0 | <i>S. frugiperda</i>  | (Ihara et al., 2007)                            |
| <b><math>\beta</math>-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase (Mnfg)</b>          | <i>M. musculus</i>  | 2J0A | <i>S. frugiperda</i>  | (Jinek et al., 2006)                            |
| <b><math>\beta</math>-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase (C2GnT-L)</b>       | <i>M. musculus</i>  | 2GAK | <i>C. griseus</i> CHO | (Pak et al., 2006)                              |
| <b><math>\beta</math>-1,2-N-acetylglucosaminyltransferase (GnT- I)</b>        | <i>O. cuniculus</i> | 2AM3 | <i>C. griseus</i> CHO | (Gordon et al., 2006)                           |
| <b><math>\alpha</math>-N-acetylgalactosaminyltransferase 2 (ppGalNAcT-2)</b>  | <i>H. sapiens</i>   | 2FFU | <i>P. pastoris</i>    | (Fritz, Raman, & Tabak, 2006)                   |
| <b><math>\alpha</math>-N-acetylgalactosaminyltransferase T1 (ppGalNAcT-1)</b> | <i>M. musculus</i>  | 1XHB | <i>P. pastoris</i>    | (Fritz, Hurley, Trinh, Shiloach, & Tabak, 2004) |

## **I.2.3. Utilisation des GTs pour la biotechnologie**

### **➤ Intérêt en biotechnologie**

Les glycosyltransférases synthétisent de manière concertée et avec une grande spécificité des glycanes complexes qui, comme cela a été décrit plus haut, jouent des rôles extrêmement variés dans de nombreux processus biologiques et pathologiques. Les GTs sont potentiellement des cibles intéressantes pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques dans un contexte de cancer, inflammation ou infection microbienne. Le développement d'inhibiteurs de ces enzymes est donc d'un intérêt considérable en glycobiologie. La diversité des produits naturels glycosylés est également largement exploitée par l'industrie pharmaceutique dans sa quête de nouvelles molécules bioactives (ex : antibiotiques, anti-diabétiques, anti-cancéreux). Les glucides permettent souvent d'améliorer la solubilité, la stabilité ou la bio-activité des molécules. Ils influencent aussi leur détoxification (Bowles, Isayenkova, Lim, & Poppenberger, 2005 ; Bowles, Lim, Poppenberger, & Vaistij, 2006) ou leurs propriétés antibactériennes (Czemplik, Kulma, Bazela, & Szopa, 2012). Les GTs présentent donc un fort intérêt pour la synthèse de composés glycosylés à haute valeur ajoutée. Beaucoup sont déjà employées en tant que catalyseurs « synthétiques » en cosmétique, et pour la synthèse de matériaux bio-sourcés (De Bruyn, Maertens, Beauprez, Soetaert, & De Mey, 2015). Elles permettent notamment de s'affranchir d'étapes complexes de chimie des sucres, qui nécessitent généralement des catalyseurs coûteux et produisent des déchets toxiques (Thibodeaux, Melançon, & Liu, 2007 ; De Bruyn et al., 2015). Les GTs contrôlent parfaitement la manière dont chaque résidu de sucres est connecté et atteignent parfois un taux de conversion proche de 100 %. Elles permettent ainsi d'obtenir des structures impossibles à synthétiser efficacement par des réactions chimiques (B. G. Davis, 2002 ; Bowles et al., 2006 ; De Bruyn et al., 2015).

### **➤ Ingénierie des glycosyltransférases**

En revanche, le pendant du haut niveau de précision, caractéristique à cette famille d'enzymes, est la stringence dont elles font preuve notamment vis-vis de leurs substrats accepteurs. De manière générale, une glycosyltransférase n'est efficace que pour une molécule, ou un petit groupe de molécules structurellement proches. Cette particularité limite leur utilisation, et c'est là-dessus que se focalisent beaucoup de recherches d'ingénierie enzymatique. Beaucoup d'études visent à faire en sorte qu'une GT donnée puisse accommoder une plus grande diversité de substrats en son site actif et les transformer efficacement. Trois approches sont classiquement utilisées, souvent de manière complémentaire : (i) la conception rationnelle, qui consiste à focaliser les efforts sur des acides aminés clés, identifiés à partir de données structurales. (ii) Le « domain swapping » où des domaines distincts (de 25 à 500 acides aminés) de

différentes protéines sont combinés afin d'en créer une nouvelle, dite « chimérique ». Cette dernière possède alors des propriétés différentes (ou cumulées) des molécules parentales. Et (iii) la mutagenèse, qui consiste à modifier des acides aminés soit de manière totalement aléatoire, soit sur des portions de séquences ou des sites précis à partir d'informations préalables. Le terme « évolution dirigée » est souvent utilisé pour ces deux dernières approches. Toutes deux s'appuient sur un ensemble de techniques qui reproduisent les mécanismes de l'évolution, afin de guider une protéine vers une fonction déterminée. De nombreux exemples d'ingénierie de GTs ont été décrits dans la littérature (Griffith & Thorson, 2006 ; Chang et al., 2011 ; Thuan & Sohng, 2013 ; J. Xiao, Muzashvili, & Georgiev, 2014). Dans ce qui suit, j'ai sélectionné quelques exemples illustrant les différentes approches citées plus haut.

Le groupe du Pr J.S. Thorson (Université du Kentucky, USA) a travaillé plusieurs années sur OleD, qui catalyse la glycosylation de l'oléandomycine, un antibiotique produit par *Streptomyces antibioticus*. Les chercheurs ont dans un premier temps élargi sa gamme de substrat par mutagenèse. Ils ont sélectionné un mutant grâce à la propriété de l'un des nouveaux accepteurs, qui n'émet de la fluorescence uniquement quand il n'est pas glycosylé. Le variant obtenu avait ainsi la capacité de glycosyler sept autres aglycones et d'utiliser 12 nouveaux donneurs avec 7 à 300 fois plus d'activité de transfert (Williams, Zhang, & Thorson, 2007). Le groupe a dans un second temps montré la capacité de ce mutant à glycosyler plus de 70 accepteurs. Concernant les substrats acceptés à la fois par le mutant et la protéine d'origine, les taux de conversion étaient presque toujours meilleurs avec le mutant (Gantt, Goff, Williams, & Thorson, 2008). La structure de l'enzyme, résolue par une autre équipe (Bolam et al., 2007) a permis d'identifier la position des trois seules mutations responsables du gain d'activité chez le mutant. Parmi elles, la plus avantageuse est située dans une boucle impliquée dans la liaison avec l'accepteur. Les deux autres sont proches du site actif et impliquées dans la liaison avec le donneur. L'information de ces zones cruciales de la protéine OleD a ensuite permis de mettre en place une mutagenèse dirigée plus rationnelle. Les auteurs ont aussi pu travailler sur la novobiocine, un antibiotique à fort intérêt médical (Williams, Goff, Zhang, & Thorson, 2008).

La technique du « domain swapping » a été utilisée principalement sur des GTs de type GT-B. Je citerai à titre d'exemple la stratégie utilisée par Krauth et al (2009), pour introduire une nouvelle fonctionnalité à une GT bactérienne de type GT-B (Krauth, Fedoryshyn, Schleberger, Luzhetskyy, & Bechthold, 2009). LndGT1 de *S. globisporus* attache le deuxième résidu de sucre (un D-Olivose) à la landomycine, un antibiotique produit par les *Streptomyces*. LndGT1 est similaire à 91 % à une autre GT-B : LanGT1, de *S. cyanogenus*. Cette dernière est dotée de la même fonction que LndGT1, mais aussi de celle d'ajouter un D-Olivose au quatrième résidu de l'oligosaccharide synthétisé par *S. cyanogenus* sur la Landomycine. Il s'agit d'une GT dite « itérative ». Grâce au fort taux d'homologie entre les deux protéines et sachant que les zones d'interactions avec

l'accepteur se trouvent dans le domaine N-ter des GT-B, les auteurs n'ont échangé que des petites régions ciblées de l'enzyme, d'environ 20 acides aminés. Ils ont ainsi transféré à LndGT1 la capacité à effectuer elle aussi une glycosylation itérative, c'est à dire d'ajouter un groupement en position 2 et 4 de l'oligosaccharide accepteur. La technique du domaine *swapping* a aussi été utilisée avec succès pour diminuer la stringence de KanF, une GT-B impliquée dans la glycosylation de l'antibiotique kanamycine (Rich et al., 2009).

La combinaison d'approches (structure, domaine *swapping* et mutagenèse) peut permettre de déterminer une stratégie idéale pour limiter l'ampleur des criblages à partir d'un faisceau de connaissances limitées. Ceci a par exemple été le cas pour UGT85H2, de la luzerne *Medicago truncatula*. Cette GT, dite « multifonctionnelle », est active vis-à-vis de divers métabolites secondaires de végétaux tels que le kaempférol, la biocianine A et l'isoflavone. Ces (iso)flavonoides possèdent diverses propriétés biologiques (L. Li et al., 2007). Les auteurs ont effectué de la mutagenèse sur la base de données structurales, afin d'élucider le rôle de différents résidus pour la liaison aux substrats. Les données d'autres enzymes de structures similaires couplées à du « *docking* », ont permis de limiter le nombre d'acides aminés candidats pour les mutations. Parmi les mutants intéressants, l'un bénéficie d'un gain d'efficacité d'un facteur 20 et 30 selon l'accepteur choisi. Un autre possède désormais une activité de déglycosylation.

La O-glucosyltransférase de *Brassica napus* a été modifiée sur un principe similaire. Les auteurs se sont basés sur la structure d'une autre UGT, homologue et bifonctionnelle (N- et O-glycosylation) d'*Arabidopsis thaliana*. Ces informations structurales ont permis de cibler les domaines à échanger avec l'enzyme de *B. napus*. Seulement deux mutations ont finalement conféré à cette enzyme la capacité de glycosyler un nouveau type d'accepteur, très différent (Brazier-Hicks et al., 2007). En plus de montrer la possibilité de modifier des UGTs de plantes en vues d'implications industrielles, ces deux études illustrent l'utilité des données structurales et de leur complémentarité avec les techniques de modélisation et d'évolution dirigées.

## ➤ Utilisation de fucosyltransférases

Il existe aussi de nombreux exemples d'utilisation *in-vitro* de glycosyltransférases non modifiées. Je me bornerai à en citer quelques uns, qui concernent des fucosyltransférases et qui sont en relation proche avec l'intérêt de mes travaux de thèse.

Ihara et al. ont utilisé différentes fucosyltransférases pour fucosyler des chitooligosaccharides de structure (GlcNAc $\beta$ 1,4)<sub>n</sub> (Ihara et al., 2013). Cette classe de composés est connue pour ses nombreuses propriétés, notamment d'antioxydants, anti-tumoral et anti-hypertenseurs (Aam et al., 2010 ; Je & Kim, 2012 ; Kim et al., 2012) . Les

facteurs NOD, molécules signal de la symbiose rhizobium-légumineuse, comportent également une fraction chitooligosaccharidique liée à un lipide. Chez la bactérie de type *Rhizobium*, qui produit le facteur NOD, celui-ci peut être fucosylé par une  $\alpha$ 1-6 fucosyltransférase (NodZ), dont la structure est très similaire à FUT8, une  $\alpha$ 1-6 fucosyltransférase humaine (Brzezinski et al., 2007 ; Ihara et al., 2007). La seule différence entre ces deux enzymes est l'accepteur sur lequel elles branchent le fucose : FUT8 branche un fucose sur le GlcNAc proximal des N-glycannes des mammifères et NodZ sur le GlcNAc à l'extrémité réductrice du facteur NOD. En combinant les deux enzymes, les auteurs ont réussi à fucosyler des chitooligosaccharides (tetra- à hexasaccharides) en deux sites distincts, les rendant ainsi plus résistants à l'action des glycosidases (Ihara et al., 2013). Ces nouvelles caractéristiques peuvent rendre ce type de molécules davantage bio-disponibles pour des applications médicales ou industrielles.

La fucosyltransférase AtFuT1 d'*A. thaliana* a aussi été utilisée *in vitro* pour modifier un polysaccharide. Sa structure prédite est très proche de FUT8 et NodZ (prédiction PHYRE 2 : <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>). Elle ajoute un fucose par une liaison  $\alpha$ 1-2 sur un résidu galactose du xyloglucane. Ce polysaccharide extrait de matériel végétal est très utilisé dans les secteurs du textile, papeterie, alimentation et pharmacie (J. Kochumalayil, Sehaqui, Zhou, & Berglund, 2010 ; Liu, Willför, & Xu, 2015). Cependant, l'hétérogénéité des structures obtenues après extraction limite l'étude de ses propriétés rhéologiques et certaines applications (Zhou, Brumer, & Teeri, 2009 ; Silipo et al., 2012). L'utilisation d'une glycosynthase mutée a permis à Spadiut et son équipe de synthétiser *in-vitro* un polysaccharide homogène, à partir d'un seul type de fragments de xyloglucane hydrolysé. L'utilisation de la fucosyltransférase AtFuT1 a ensuite permis de fucosyler le polymère, de manière régulière (Spadiut et al., 2011). Cette synthèse et la modification *in-vitro* de xyloglucane permettront d'étudier plus spécifiquement ses propriétés rhéologiques et ses interactions avec la cellulose.

Ces quelques exemples ci-dessus montrent le potentiel énorme d'applications des GTs naturelles ou modifiées. Ces enzymes sont de plus en plus utilisées dans des procédés de « glycodiversification » (ou *glycorandomisation*) qui consistent à augmenter la diversité des molécules glycosylées, ou pour fabriquer des motifs glycanniques précis avec un haut niveau de fiabilité. A ce jour, les applications sont principalement médicales, cosmétiques et alimentaires. La famille des GT-B comporte la plupart des GTs impliquées dans les étapes tardives de biosynthèse de composés naturels (Krauth et al., 2009). Ceci en fait des candidates idéales pour générer des glycoconjugués aux propriétés nouvelles ou améliorées. Pour ce faire, les approches utilisées sont soit l'ingénierie rationnelle, soit l'évolution dirigée couplée à des cribles à haut débit. La combinaison des deux s'avère souvent fructueuse, étant donnée la complexité et la diversité structurale particulière de ces enzymes. Le développement de ce type de projets nécessite de disposer d'informations structurales et de cribles à haut débit.

Cependant, ces deux éléments font souvent défaut : si l'on prend le cas des fucosyltransférases, seulement quatre structures, tout organisme confondus, ont été publiées à ce jour. Le criblage et la quantification d'activité reste une difficulté majeure pour de nombreux laboratoires.

## I.3. La paroi primaire des eudicotylédones

### I.3.1. Description et rôle de la paroi primaire

L'une des caractéristiques majeures des plantes terrestres est la capacité à développer des organes offrant de très grandes surfaces, pour effectuer la photosynthèse et puiser l'eau avec les éléments nécessaires à leur croissance. Force et flexibilité leur permettent de résister à l'impact de la pluie, aux fortes bourrasques de vent, et de pénétrer des sols compacts. Cette robustesse mécanique est conférée par deux attributs essentiels des cellules végétales. Ces dernières comportent à la fois une large vacuole emplies d'eau, induisant une forte pression de turgescence vers l'extérieur (0,5 – 1,5 MPa) et une solide paroi autour de la membrane plasmique, capable de compenser cette force ([Figure I.11](#)).

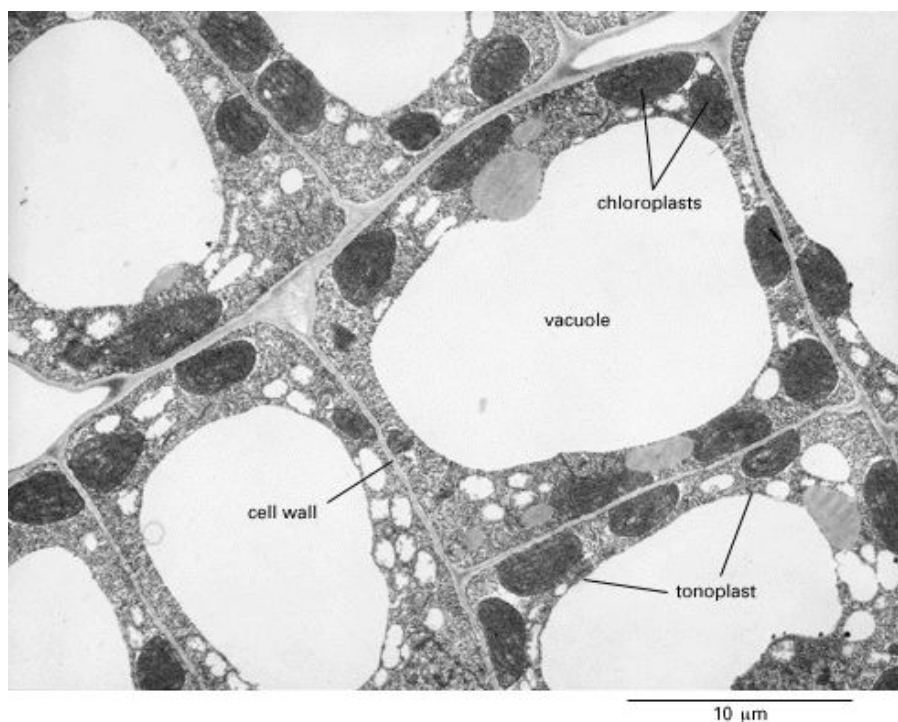


Figure I.11 : Paroi cellulaire et vacuole

([middleschoolscience, 2010-11 Cell Wall, Cell Membrane, Vacuole](#))

En principe, la croissance d'une cellule pourrait être induite par le changement de l'un des deux paramètres, mais c'est généralement une modification de la paroi qui

en est à l'origine. La paroi des cellules en croissance consiste en une couche fine (0,1 – 1  $\mu\text{m}$  d'épaisseur) et flexible, composée de polysaccharides interconnectés, de protéines structurales telles que des protéines hyper glycosylées, d'enzymes de remodelage, et de minéraux (Cosgrove, 2005 ; Bashline, Lei, Li, & Gu, 2014). Malgré sa finesse relative, la paroi comprime le reste de la cellule à la manière d'un corset, maîtrise sa taille et lui confère sa forme. A titre d'exemples, les cellules des vaisseaux du xylème peuvent atteindre un volume supérieur à 30 000 fois la taille des cellules non spécialisées du méristème, les cellules constituant les poils à la surface des graines de coton s'allongent un millier de fois avant de devenir matures (Cosgrove, 2005). L'extension cellulaire peut être très localisée et aboutit à une grande diversité de formes. (Figure I.12).

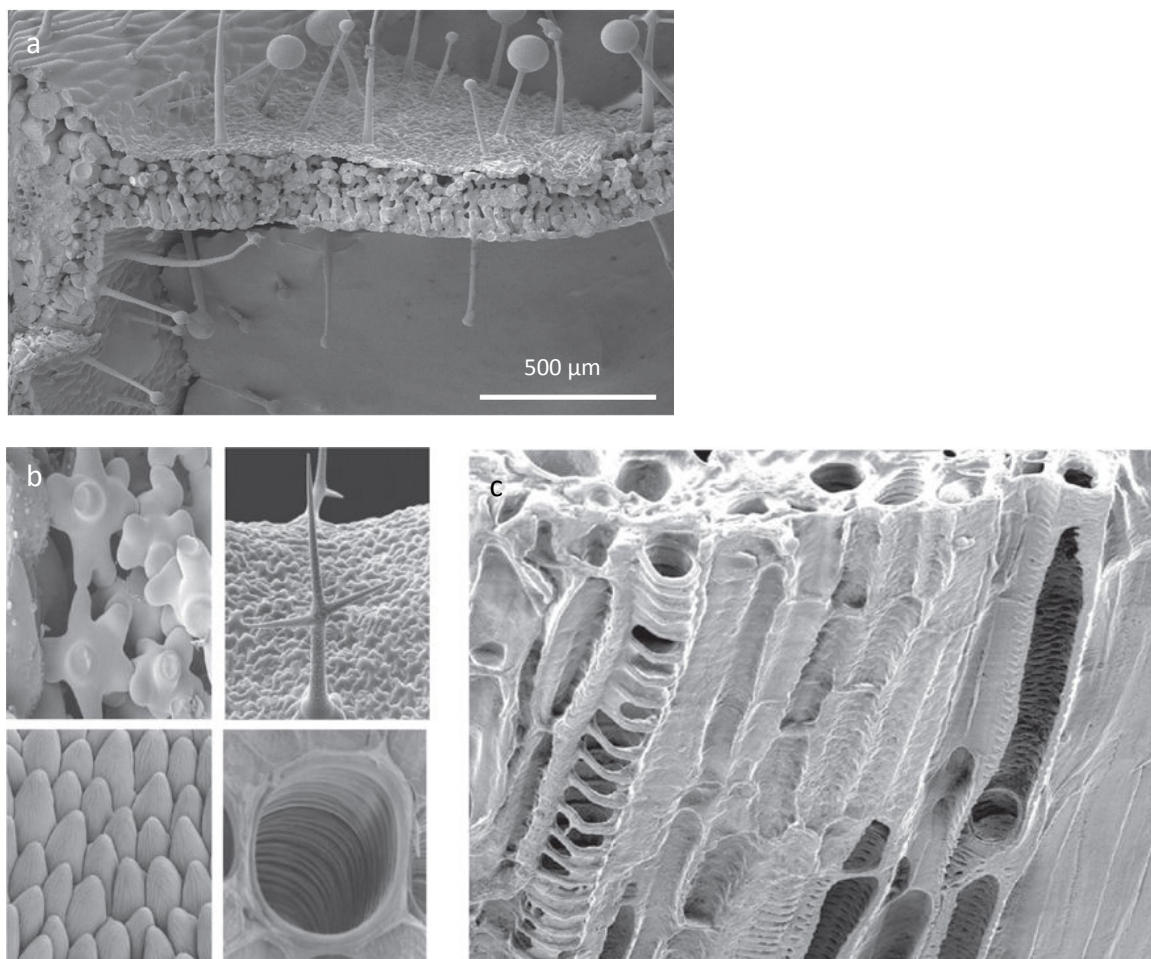


Figure I.12 : La paroi conditionne la forme et les propriétés mécaniques des cellules végétales.

a) feuille mature de *Nicotiana benthamiana* (tabac) avec les cellules parenchymateuses à la paroi fine composant la majorité du tissu, les trichomes, en forme de poils. Burton et al, 2010. DOI 10.1038/nchembio.439. b) cellules parenchymateuses en forme d'étoiles, cellules coniques d'épiderme, extrêmement allongées (trichomes), et cellules de xylème avec une forme tubulaire pour conduire l'eau. c) coupe longitudinale d'un tissu vasculaire d'*Arabidopsis*. Microscopie électronique à balayage Höfte et al, 2009. DOI: 10.1016/j.cub.2010.03.046.

Ce contrôle de la croissance se fait par la maîtrise de l'hydratation, du relâchement ou de la densification des liaisons entre les molécules de la paroi, ainsi que par le dépôt de nouveaux polysaccharides. Ainsi, la cellule végétale possède la capacité d'assembler sa paroi, mais aussi d'en modeler finement la composition. Cela implique l'existence de mécano-senseurs, de voies de signalisations et de systèmes de rétrocontrôles complexes, encore mal identifiés (Wolf, Hématy, & Höfte, 2012). L'ensemble de ces mécanismes permet de faire évoluer la paroi au fil de la vie de la cellule, jusqu'à faire apparaître des différences de morphologies caractéristiques. On distingue classiquement deux types de parois dites « primaires » ou « secondaires », selon qu'elles sont extensibles (tissus jeunes, non différenciés) ou non-extensibles (tissus différenciés), respectivement (Figure I.13). Celles des jeunes cellules sont flexibles pour permettre la croissance et poreuses de manière à laisser diffuser librement l'eau, les nutriments et les hormones à travers les tissus. Les parois dites secondaires sont ajoutées dans un deuxième temps, entre la membrane plasmique et la paroi primaire de certaines cellules différenciées. Beaucoup plus épaisses, elles apportent un important renforcement structural. Elles peuvent comporter de la lignine et devenir alors imperméables, comme par exemple le long des vaisseaux conducteurs où passent l'eau et les nutriments sur de longues distances. Entre deux cellules, une zone de la paroi, appelée « lamelle moyenne », permet de maintenir la cohésion des cellules adjacentes (Figure I.13).

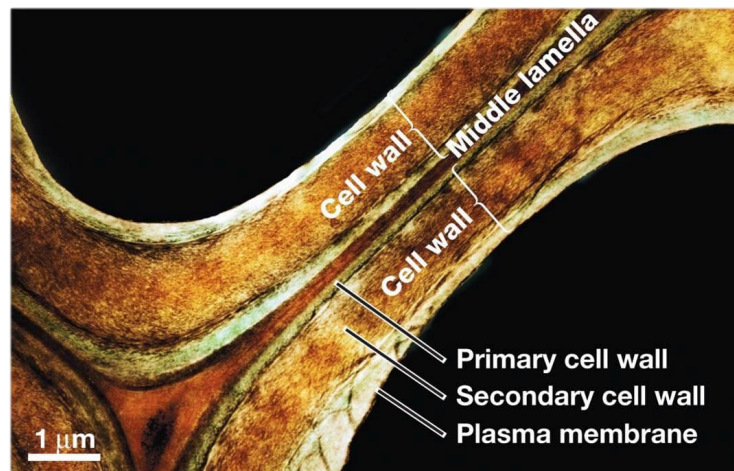


Figure I.13 : Paroi primaire, secondaire et lamelle moyenne entre deux cellules végétales.

StudyBlue, 2011, Pearson education, inc.

Hormis le développement de la plante, les parois des végétaux sont impliquées dans de nombreuses autres fonctions telles que la résistance au stress biotique : elles sont la première interface avec les microorganismes symbiotiques et pathogènes. L'une des réactions de défense de la plante implique un mécanisme sophistiqué de gestion de l'intégrité de la paroi (Pogorelko, Lionetti, Bellincampi, & Zabolina, 2013). Par exemple, des molécules endogènes produites dans des tissus endommagés (ou *damage-associated molecular patterns, DAMPs*) sont reconnues par des récepteurs membranaires (Ferrari,

2013). Cette perte d'intégrité modifie l'expression des gènes impliqués dans la constitution de la paroi. Elle induit une variété de réponses, similaires à l'arrêt du cycle de croissance de la cellule, pouvant être très localisées. A la suite d'une infection, la cellule va typiquement sécréter davantage de constituants pariétaux, augmenter le nombre de liaisons entre eux et déshydrater sa paroi (Wolf, Hématy, & Höfte, 2012).

### I.3.2. Les polysaccharides de la paroi végétale

Les polysaccharides représentent 90 % du poids sec de la paroi végétale primaire. Parmi eux, on distingue la cellulose, les hémicelluloses et les pectines. Assemblée en microfibrilles cristallines, la cellulose représente 30 à 90 % des polysaccharides et sert de charpente à la paroi. Elle est intriquée dans un réseau complexe formé par les hémicelluloses et les pectines qui interagissent avec l'eau pour hydrater la structure et former un gel matrice (Figure I.14).

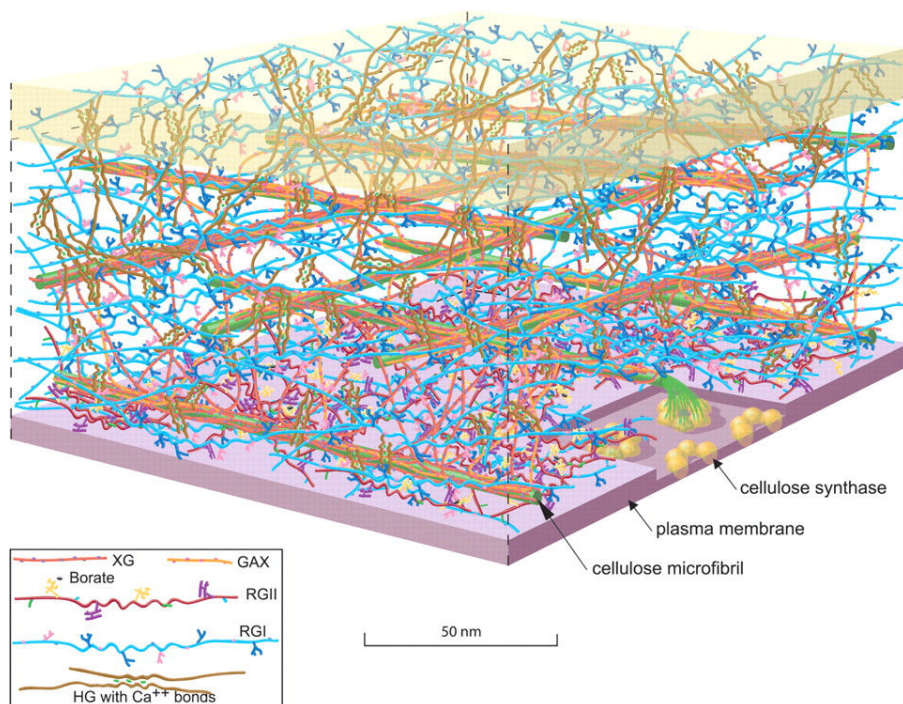


Figure I.14 : Schéma des polysaccharides de la paroi primaire d'une cellule d' *Arabidopsis*.

Représentation à l'échelle. La quantité de chaque polysaccharide représenté est basée sur son ratio approximatif avec la cellulose. Pour plus de clarté, la quantité de matière a été diminuée et la distance entre fibres de cellulose agrandie. La taille des hémicelluloses les reliant entre elles est donc exagérée. Somerville, 2004. DOI : 10.1126/science.1102765.

Les hémicelluloses et pectines sont aussi appelées « polysaccharides non-cellulosiques ». Ils comprennent une douzaine de polymères différents, dont les compositions et les structures varient fortement à travers le règne végétal (K. J. D. Lee, Marcus, & Knox, 2011). Ces structures complexes présentent aussi de très grandes hétérogénéités, que ce soit entre les tissus, au niveau moléculaire et entre espèces (Burton, Gidley, & Fincher,

2010). Cette diversité inter-espèce serait révélatrice de différents chemins évolutifs empruntés par les végétaux (Del Bem & Vincentz, 2010 ; Domozych et al., 2012 ; Fangel et al., 2012). Tous convergent cependant vers un seul résultat physico chimique : la propriété à former un gel matrice.

### ➤ La cellulose

La cellulose est le bio-polymère le plus abondant sur Terre. Présente chez toutes les plantes terrestres, elle est le polysaccharide majoritaire de la paroi de la plupart des végétaux (Saxena & Brown, 2005). La structure primaire de la cellulose consiste en un enchaînement linéaire de 8 000 à 15 000  $\beta$ -(1,4)-glucose. Du fait de liaisons hydrogènes et d'interactions hydrophobes, les chaînes de glucose s'associent spontanément par douzaines. Cela forme des micro-fibrilles cristallines de 3-5 nm, solides et très résistantes (figure I.15).

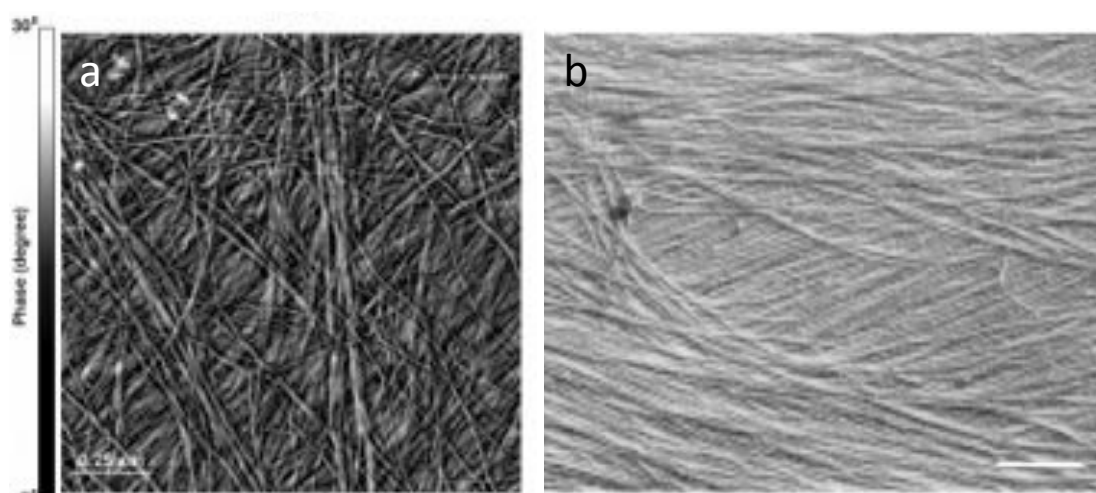


Figure I.15 : image de microfibrilles de cellulose.

a) Paroi végétale de cellule de parenchyme de maïs, de microscopie à force atomique. Ech : 25 nm. Yarbrough, 2009, DOI : 10.1186/1754-6834-2-17. b) Cellules d'*Arabidopsis*, microscopie électronique. Ech = 100 nm. Li, 2014. DOI : 10.1199/tab.0169.

Ces fibres sont assez longues pour s'enrouler plusieurs fois autour de la cellule. Cette charpente pariétale confère à la cellule sa résistance au stress externe, à la pression osmotique et aux attaques enzymatiques. La cellulose, avec la lignine, se trouve typiquement en proportion plus importante dans les parois secondaires, une fois la croissance de la cellule terminée. Les chaînes de cellulose peuvent varier quant à leur longueur ou degré de cristallinité, mais la structure chimique fondamentale reste globalement identique entre organes, tissus, et différentes plantes.

### ➤ Les hémicelluloses

Les hémicelluloses représentent un groupe très varié de polysaccharides à travers le règne végétal. Elles composent, avec les pectines, la matrice de la paroi. Elles se

définissent comme étant une chaîne principale de résidus monosaccharidiques liés en  $\beta$ -(1,4), à l'instar de la cellulose, ou simplement comme des polymères capables de se lier à cette dernière. À la différence de la cellulose, presque toutes les hémicelluloses comportent des substitutions par des monosaccharides ou petits oligosaccharides sur la chaîne principale régulière. C'est le cas pour les xyloglucanes, hétéroxylanes, et galacto-glucos-mannanes (Figure I.16).

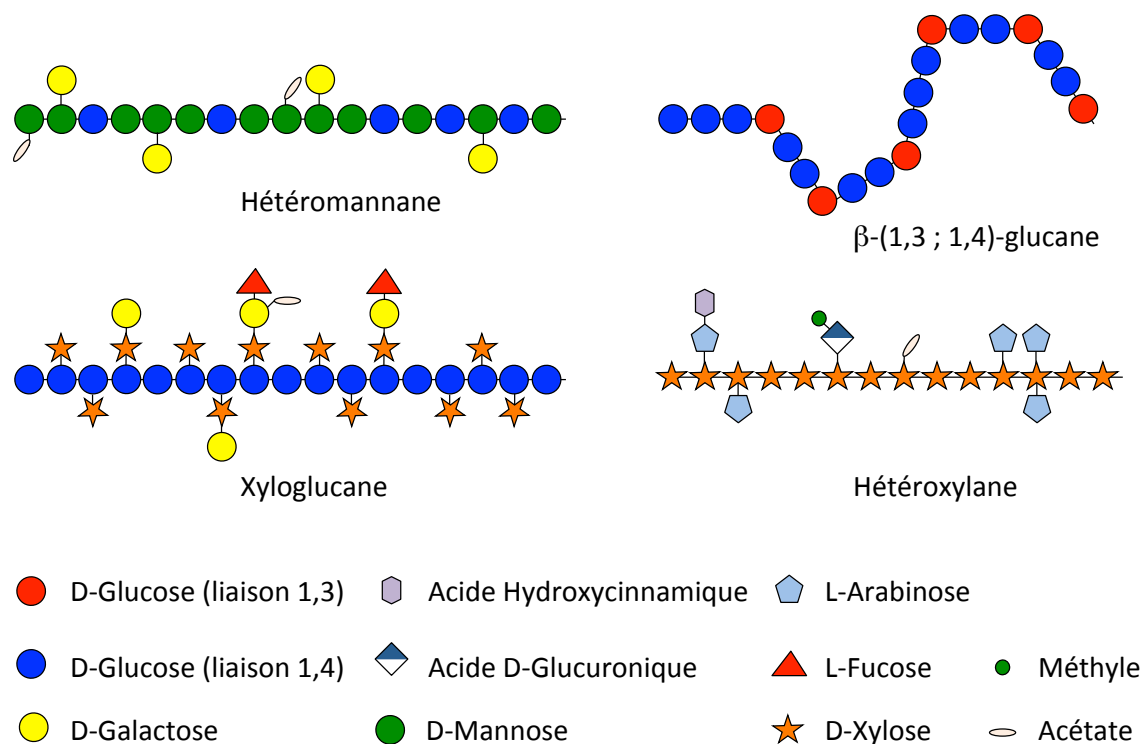


Figure I.16 : Structures d'hémicelluloses principalement rencontrées chez les plantes terrestres.

Une seule molécule est représentée par famille. La chaîne principale des structures de xyloglucane,  $\beta$ -(1,3 ; 1,4)-glucane, hétéroxylane et hétéromanane sont basées sur un enchainement de monosaccharides liés en  $\beta$ -(1,4). Image : F. Cicéron.

Le  $\beta$ -(1,3 ; 1,4)-glucane ne possède pas de substitution, mais la présence d'unités glucose liées en  $\beta$ -(1,3) qui apparaissent tous les 3 ou 4 résidus liés en  $\beta$ -(1,4) casse la linéarité de la chaîne principale. La présence de petites ramifications et/ou d'irrégularités de liaisons dans la chaîne principale sont deux stratégies aboutissant au même résultat : ces polymères ne peuvent pas s'aligner, ce qui leur empêche de s'agréger en composés fibrillaires insolubles. Quant aux parties homogènes et non substituées des chaînes principales, elles confèrent la propriété inverse : celle d'induire des interactions locales entre chaînes de glucanes. Elles agissent comme des « zones de jonctions », notamment avec la cellulose, en s'associant avec les microfibrilles (Figure I.13 et Figure I.14). Ces

capacités combinées de solubilisation et de liaison inter-chaînes sont caractéristiques des hémicelluloses et contribuent fortement à fabriquer le gel matrice de la paroi, aux propriétés modulables selon les besoins. En plus de leur rôle structural, les hémicelluloses peuvent aussi servir de réserve nutritionnelle pour certaines plantes. La paroi des cellules de stockage devient alors extrêmement épaisse. C'est le cas notamment dans les graines de tamarin, contenant une quantité importante de xyloglucane non fucosylé (Desveaux, Faik, & Maclachlan, 1998). Enfin, des fragments d'hémicelluloses sont impliqués dans la régulation de la croissance et dans les voies de signalisations associées à une perte d'intégrité membranaire. Des fragments précis d'oligosaccharides de xyloglucane, reconnus par des récepteurs spécifiques, initient des changements cellulaires suite à des attaques pathogènes (York, Darvill, & Albersheim, 1984).

Le type d'hémicellulose et ses caractéristiques varient beaucoup entre espèces et même entre les tissus. Par exemple, le xyloglucane est l'une des hémicelluloses principales des eudicotylédones (incluant la plupart des plantes à fleurs). Il est par contre peu présent, tout comme les pectines, chez les *Poaceae* : une famille des monocotylédones qui inclut notamment la majorité des céréales d'intérêt agronomique (blé, maïs, riz, orge...). En effet, dans la classe des monocotylédones, ce sont les hétéroxylanes et les  $\beta$ -(1,3 ; 1,4)-glucanes qui représentent les hémicelluloses majoritaires (Burton et al., 2010 ; Burton & Fincher, 2014). Les mannanes, galactomanannes et galactoglucomannanes sont typiquement très présents dans l'endosperme des légumineuses, partie de la graine contenant les réserves pour les premiers stades de son développement.

Les hémicelluloses présentent une importante hétérogénéité au niveau moléculaire, y compris entre organes et au sein d'une même paroi. Le xyloglucane (XyG) illustre bien la diversité de structures pouvant être rencontrée avec une hémicellulose donnée. Cette molécule est constituée d'un enchaînement de  $\beta$ -(1,4) glucoses, substitués sur environ 80 % de sa chaîne au niveau du carbone 6 du cycle (figure 1.17). Les chaînes latérales, distribuées de manière régulière, sont typiquement initiées par des résidus de xyloses liés en  $\alpha$ -(1,6). Ces résidus comportent eux-mêmes des branchements pour former les chaînes latérales, comportant jusqu'à quatre monosaccharides. Dix-neuf types de chaînes latérales ont été décrits à ce jour. Toutefois, seul un petit nombre d'entre elles sont retrouvées au sein d'une espèce.

De manière à nommer chaque oligosaccharide dérivé du xyloglucane de manière non ambiguë, une nomenclature spécifique a été développée (Fry et al., 1993). Cela permet typiquement de mentionner les oligosaccharides obtenus après digestion de xyloglucane par une endo- $\beta$ -1,4 glucanase. Chaque glucose de la chaîne principale est représenté par une lettre, en fonction de ses substitutions. Le nom de chaque oligosaccharide consiste alors en un code d'une séquence de lettres, organisées à partir de l'extrémité non réductrice de la chaîne de glucoses (figure 1.17).

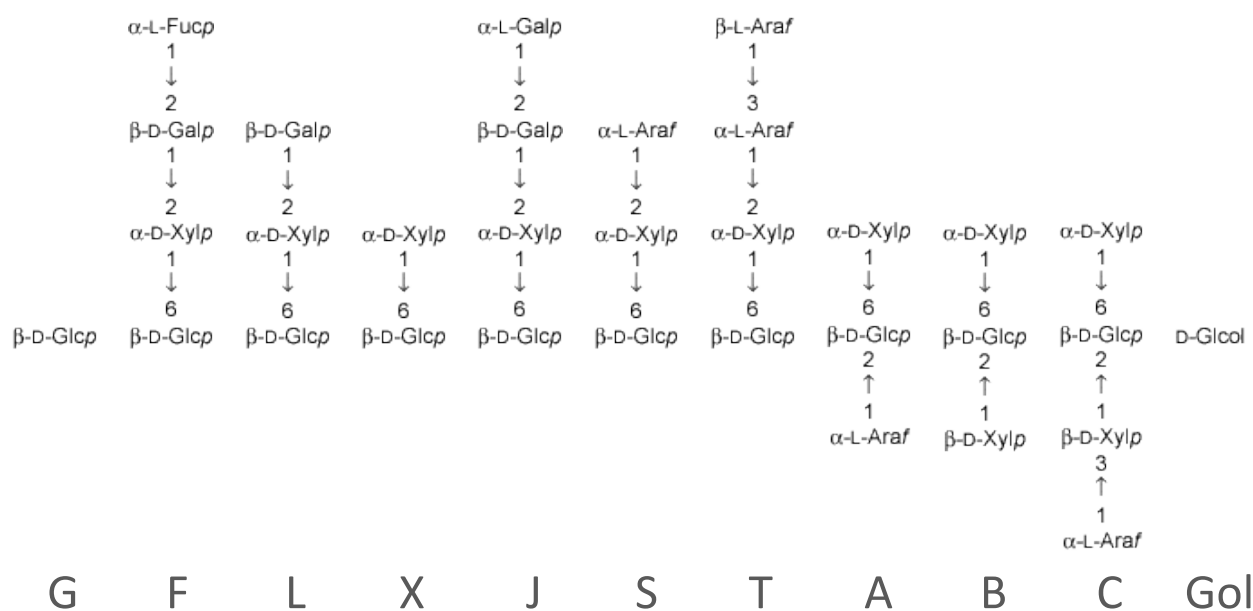


Figure I.17 : Nomenclature pour les oligosaccharides issus de xyloglucane.

Chaque chaîne secondaire est représentée par une lettre correspondant à sa dernière substitution. Le code Gol correspond à un Glc converti en alditol. Cela permet de référencer facilement les fragments de xyloglucane digérés par une endo-(1→4)- $\beta$ -D-glucanase. Issue de Fry, 1993, DOI : 10.1111/j.1399-3054.1993.tb01778

La sous-structure la plus fréquemment rencontrée chez les dicotylédones comporte une alternance des motifs suivants : (i) trois substitutions consécutives de xylose, suivies d'un glucose non substitué (XXXG), (ii) un galactose présent sur le quatrième ou le troisième et quatrième xylose (XXLG ; XLLG) et, (iii) un fucose dans les parties aériennes et tissus en croissance, sur le deuxième galactose uniquement (XXFG ; XLFG) (Figure I.16 et Figure I.17). Il est ainsi possible d'utiliser le terme généraliste de xyloglucane, mais aussi de galactoxyloglucane ou de fucogalactoxyloglucane selon le degré de substitution. Ces trois motifs se retrouvent de manière plus ou moins irrégulière sur la chaîne principale, dans toute la plante. Le fucose, par contre, est totalement absent de la majorité des organes où le XyG sert de réserve nutritionnelle. C'est le cas pour les graines de tamarin, l'une des principales sources de XyG utilisées. Parmi les autres résidus pouvant remplacer le galactose, un acide galacturonique est présent dans les racines d'*A. thaliana* (Pena, Kong, York, & O'Neill, 2012) et un arabinose chez les tomates et autres espèces de *Solanaceae*, (Ring & Selvendran, 1981). Chez *A. thaliana* et de nombreuses autres eudicotylédones, le résidu galactose est O-acétylé. Chez les *Poaceae* (herbes) et les *Solanaceae* (tomates, pommes de terre, aubergines,...), cette O-acétylation est présente sur des résidus glucoses et permettrait d'améliorer la solubilité du polymère, peu substitué.

L'utilisation d'anticorps développés contre des épitopes spécifiques de polysaccharides pariétaux permet de visualiser leur répartition autour des cellules végétales et au sein de tissus. L'anticorps « LM15 », dirigé contre les motifs XXXG de XyG, a notamment permis de montrer la variabilité d'occurrence de ce polysaccharide dans les parois des cellules observées (Marcus et al., 2008 ; K. J. D. Lee et al., 2011) (Figure I.18).

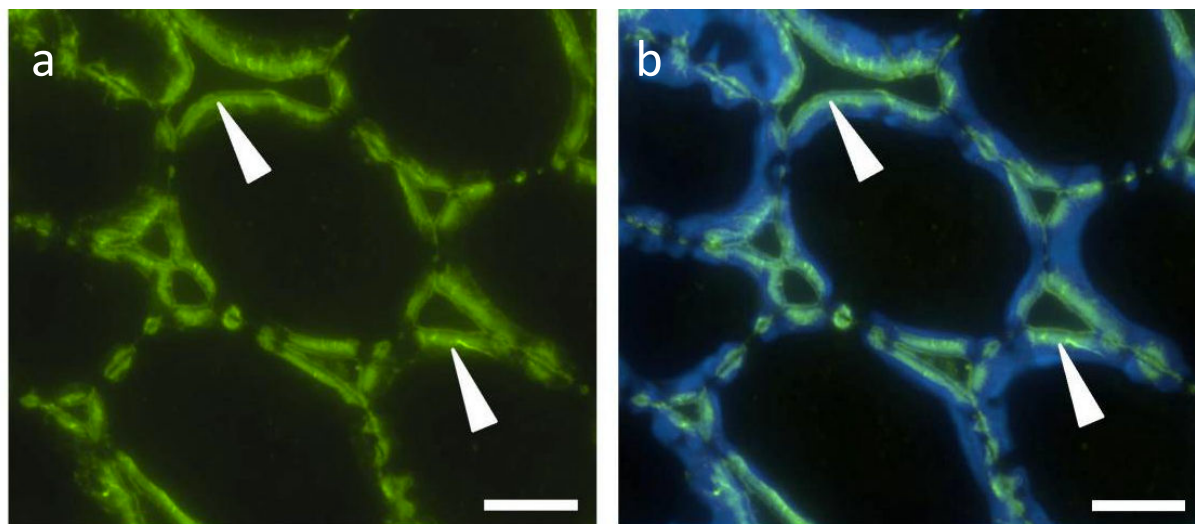


Figure I.18 : Détection d'épitopes de xyloglucane par immunofluorescence.

a) L'anticorps LM15 est appliqué sur des coupes de parenchyme de cotylédons, issus de graines *nasturtium* (cresson,...). b) Coloration fluorescente (Calcofluor White) de la cellulose, révélant l'étendue de la paroi. Les flèches indiquent les zones fortement immuno-marquées par le LM15. Ech : 20  $\mu$ m. Marcus SE, 2008, DOI : 10.1186/1471-2229-8-60.

Sur les différents clichés d'immunomicroscopie issus de tissus de cellules parenchymes de tabac et cresson, le LM15 apparaît davantage présent aux zones de la paroi primaire adjacente à la lamelle moyenne et le long des jonctions cellulaires. Cela pourrait indiquer, au sein de ces tissus, un rôle du XyG dans la formation et la stabilisation des espaces intercellulaires (Marcus et al., 2008).

### ➤ Les pectines

Les pectines sont des composés majeurs des parois primaires et le principal constituant de la lamelle moyenne chez la plupart des eudicotylédones. Elles contribuent à la force mécanique de la paroi, à sa porosité, et à gérer sa rigidité. Elles sont particulièrement présentes autour des cellules en croissance, en division, ou appartenant à des tissus souples. Leur proportion est aussi très importante au niveau des lamelles moyennes, où elles adhèrent les cellules entre elles. Les pectines sont aussi impliquées dans les procédés de signalisation inter- et intracellulaires (Mohnen, 2008 ; Melani a Atmodjo, Hao, & Mohnen, 2013). Notamment, une altération de l'intégrité de pectines par des enzymes de micro-organismes peut déclencher une réponse de défense vis-à-vis du

pathogène agresseur, et induire un remodelage approprié de la paroi (Francocci et al., 2013 ; Bellincampi, Cervone, & Lionetti, 2014). Des modifications s'effectuent alors aussi sur les pectines, par l'intensification des liaisons entre les différentes structures et la diminution de leur hydratation. Ces molécules extrêmement complexes sont subdivisées en trois principales classes de structures, telles que l'homogalacturonane, le rhamnogalacturonane I et le rhamnogalacturonane II (figure I.19). Ces sous-structures sont habituellement représentées liées à l'homogalacturonane par des liaisons glucidiques. Elles sont toutefois aussi interconnectées par d'autres types de liaisons, effectuées via des ions (ex : calcium).

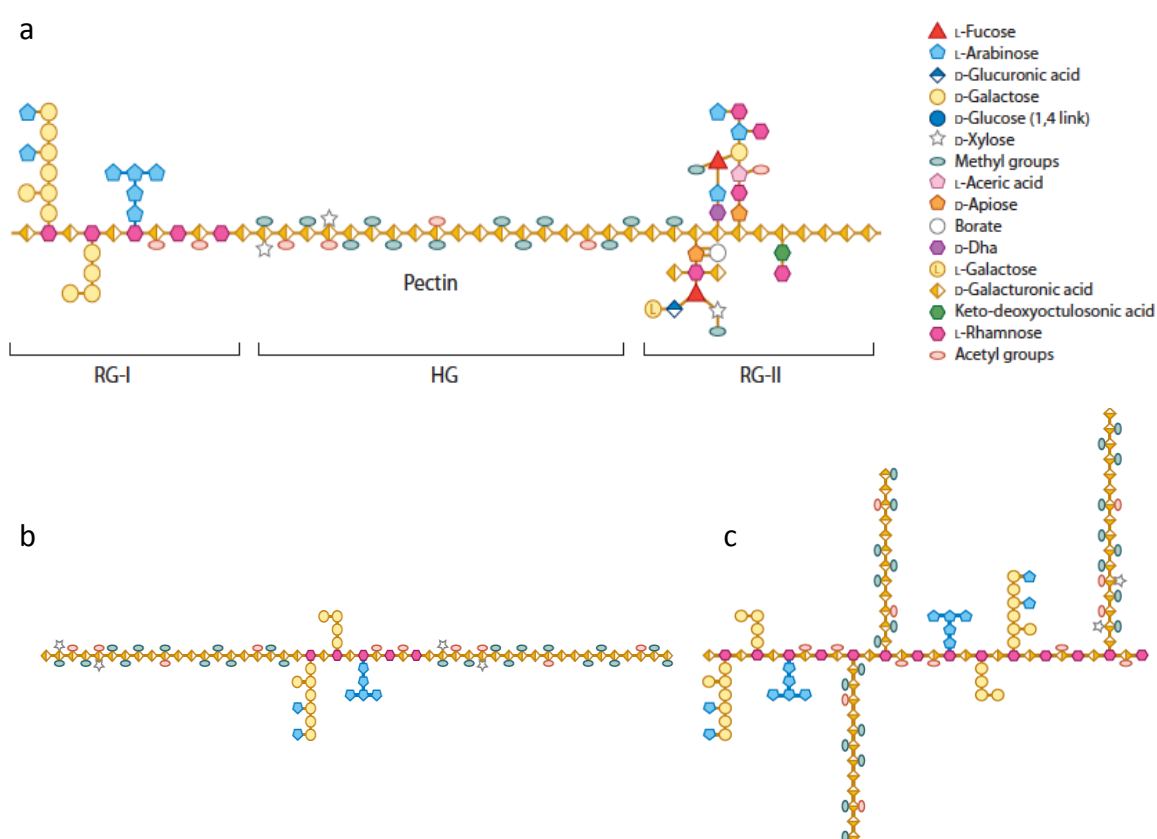


Figure I.19 : Structures de pectines.

a) Modèle de représentation des domaines rhamnogalacturonane I (RG-I), homogalacturonane (HG), et rhamnogalacturonane II (RG-II). Modèles alternatifs d'organisation de domaines pectiques avec en b) un arrangement contigu et linéaire de HG lié à du RG-I et c) des HG branchés en chaînes latérales sur des Rha de RG-I. Une combinaison des différentes formes est possible. Wolf, 2012, DOI : 10.1146/annurev-arplant-042811-105449.

**Les homogalacturonanes** sont des homopolymères d'environ 100 à 200 résidus galactoses liés en  $\alpha$ -(1,4) et représentent environ les deux tiers des pectines. Ils peuvent être liés aux hémicelluloses et à la cellulose, composant ainsi le réseau de la paroi. Ils possèdent aussi la propriété d'être modifiés par voie enzymatique avant et après leur

dépôt. Chargées négativement, les chaînes d'acides galacturoniques liés en  $\alpha$ -(1,4) chélatent les ions calciums positifs, ce qui les amène à se juxtaposer. Ce phénomène est représenté par le modèle dit de la « boîte à œufs » (figure I.20). Les fonctions carboxyliques des GaLA sont d'abord méthylées au moment du dépôt des HG, ce qui empêche ce type d'interactions. Ensuite, le niveau de méthylation est géré par des Pectines MéthylEstérases (PME), de manière à moduler la rigidité pariétale.

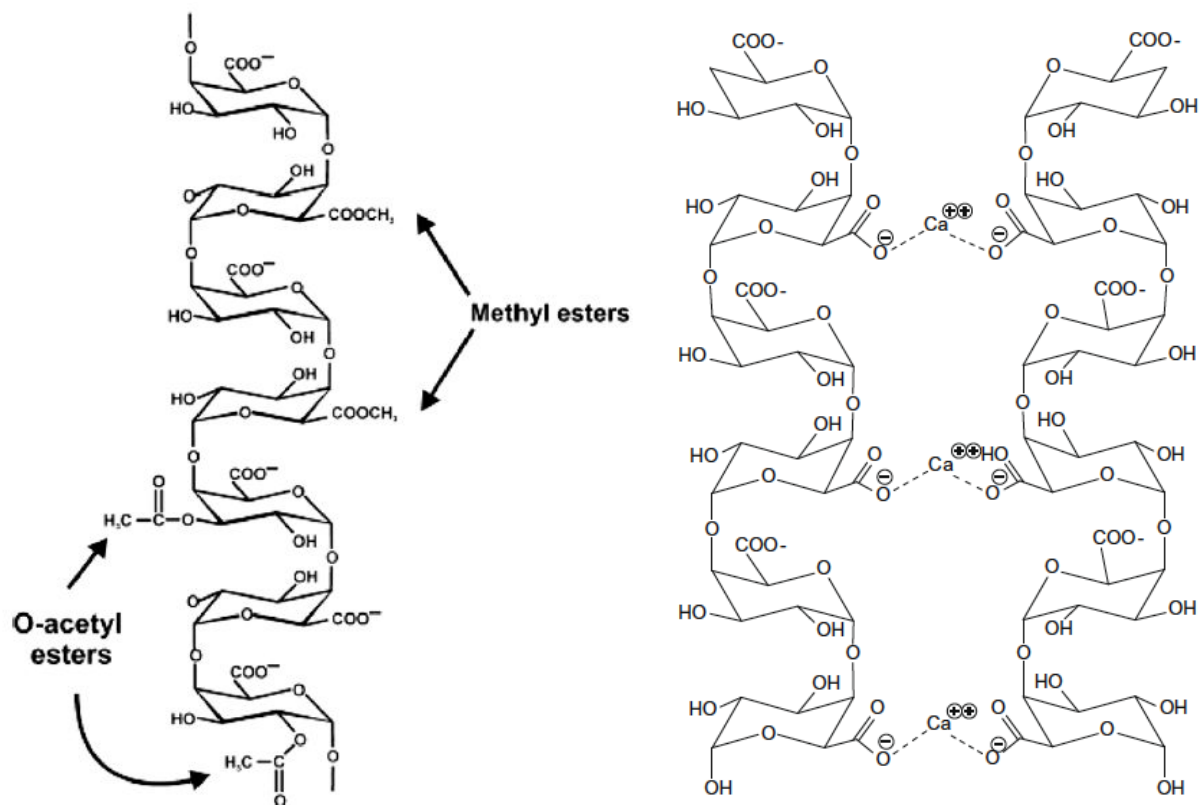


Figure I.20 : Modèle de la boîte à œufs où le calcium interconnecte les homogalacturonanes.

Les fonctions carboxyliques en C6 des GaLA sont d'abord méthylées au moment du dépôt des HG, ce qui empêche ce type d'interactions. Caffall, Mohnen,, 2009, DOI : 10.1016/j.carres.2009.05.021.

Les HG peuvent aussi être acétylés en position 2 ou 3, ou contenir sur leur chaîne principale des additions de xyloses ou d'apioses. Ils sont alors nommés apio- ou xylogalacturonane.

Les structures de rhamnogalacturonane I (RG-I) varient davantage en fonction du contexte de développement de la cellule et ils sont plutôt localisés dans la paroi primaire. Le squelette est toujours composé de la répétition d'une centaine de disaccharides  $\alpha$ -(1,4)-GalA- $\alpha$ -(1,2)-rhamnopyranose (Rhap) où la moitié des résidus rhamnosyls sont substitués par des chaînes latérales neutres d'arabinanes, de galactanes, ou d'arabinogalactanes (Lerouge, O'Neill, Darvill, & Albersheim, 1993).

Le rhamnogalacturonane II (RG-II) est le polysaccharide le plus complexe connu à ce jour. Il est constitué d'au moins 12 monosaccharides, liés entre eux par plus de vingt liaisons glycosidiques distinctes, présents sous différentes formes cycliques, séries et anoméries. Parmi ces résidus, certains sont rares ou très spécifiques. C'est le cas notamment de l'apiose (Api), de l'acide acérique, du 3-deoxy-D-lyxo-heptulosonic acide (Dha). Le RG-II n'a été observé jusqu'à aujourd'hui que chez les plantes terrestres et aurait été un élément majeur pour la colonisation de ce type de milieux. Il est très peu variable entre les espèces qui en possèdent et, bien qu'il ne représente que 3 à 8 % de la paroi primaire des eudicotylédones, il est indispensable à la croissance normale de la plante. Les chaînes de RG-II peuvent former des dimères par la coordination d'ions borates entre les résidus apioses. Cette propriété est cruciale pour le développement de la plante, mais son rôle exact n'est encore pas clairement élucidé.

### **I.3.3. Synthèse, dépôt et modification des polysaccharides pariétaux**

La synthèse des polysaccharides de la paroi implique quatre étapes majeures, quelle que soit la molécule : la production de donneurs activés (Bar-Peled & O'Neill, 2011), l'initiation de la synthèse, l'élongation, puis la terminaison.

La cellulose et les polysaccharides « non-cellulosiques » de la paroi sont synthétisés dans deux compartiments distincts de la cellule. La cellulose est synthétisée au niveau de la membrane plasmique par des celluloses synthases (CesA) agencées en rosettes hexagonales au sein du Cellulose Synthase Complexe (CSC). Bien que ce modèle soit toujours débattu, ce complexe peut comprendre jusqu'à 6 rosettes, chacune étant formée par l'assemblage de 6 protéines CesA ([figure I.21](#)). Les CesA comportent plusieurs domaines transmembranaires et un domaine catalytique central dirigé vers le cytosol (Saxena & Brown, 2005 ; Carpita, 2011 ; McFarlane, Döring, & Persson, 2014 ; S. Li, Bashline, Lei, & Gu, 2014).

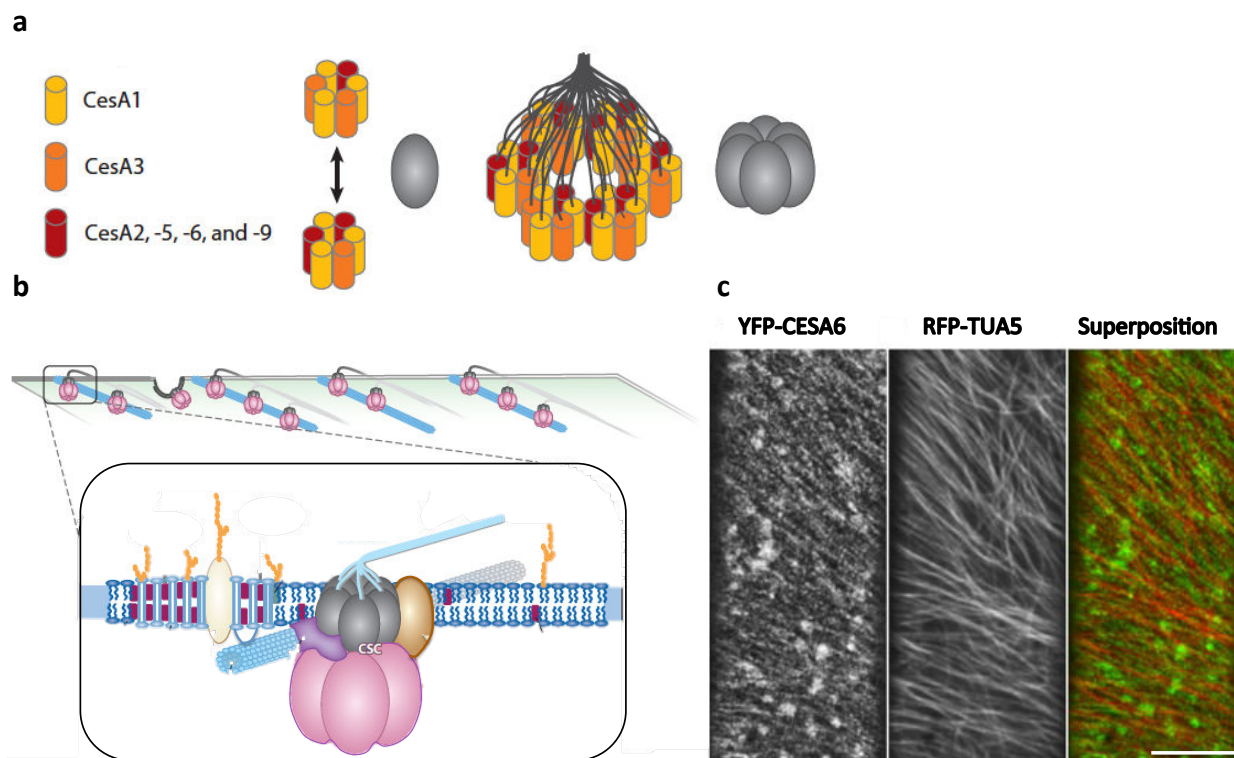


Figure 1.21 : Machinerie de la synthèse de la cellulose.

a) Les CSC (*Cellulose Synthase Complex*) forment des rosettes hexagonales contenant entre 12 à 36 protéines CesA. b) Complexes de cellulose synthases au niveau de la membrane plasmique. La vitesse et la direction de la synthèse sont influencées par l'environnement intracellulaire : notamment par l'orientation des microtubules et par l'approvisionnement en UDP-Glucose. McFarlane, 2014, DOI 10.1199/tab.0169. c) Images obtenues par microscopie confocale de CSCs et microtubules (TUA5) liés à des protéines de fusion (YFP = yellow fusion protein, RFP = red fusion protein). Cellules épidermales de semis d'*Arabidopsis* cultivés à l'obscurité. La superposition des signaux montre le coalignement des trajectoires de CSCs avec les microtubules. Ech. = 10 nm. Li, 2014. DOI : 10.1199/tab.0169.

Le mouvement des rosettes dans le plan est guidé par des microtubules sous-jacents, ce qui permet de contrôler l'orientation des microfibrilles de cellulose nouvellement synthétisées. La structure d'un complexe de cellulose synthase bactérien, contenant un polysaccharide de glucose en train d'être transloqué, a été déterminée à une résolution de 3,25 Å (Morgan, Strumillo, & Zimmer, 2013). Cette structure a permis d'identifier les acides aminés impliqués dans la catalyse, et apporte des informations sur le mécanisme de synthèse et de translocation du polymère. Entre autre, cela confirme que les glucoses sont ajoutés un par un, à partir d'UDP-glucose cytosolique, sur l'extrémité non réductrice de la chaîne polysaccharidique en croissance.

Les pectines et hémicelluloses sont synthétisées dans l'appareil de Golgi, puis transportées par des vésicules vers leur destination et incorporées à la paroi. Les chaînes principales de la majorité des hémicelluloses, constituées de glucoses liés en  $\beta$ -(1,4), sont synthétisées par des enzymes appelées « cellulose synthase like, CSL » du fait de leurs similarités structurales avec les celluloses synthases de la membrane

plasmique. Les CSL sont polytopiques : elle comportent plusieurs domaines transmembranaires. Leur site actif peut se trouver soit au niveau du cytosol, soit au sein de l'appareil de Golgi (Figure I.22). Ensuite sont ajoutés les sucres des chaînes latérales. La majorité des glycosyltransférases impliquées dans ces étapes de synthèse sont des GT de type II. Cette topologie est similaire à celle rencontrée chez d'autre organismes et aux GT impliquées dans la glycosylation des protéines (Oikawa, Lund, Sakuragi, & Scheller, 2013).

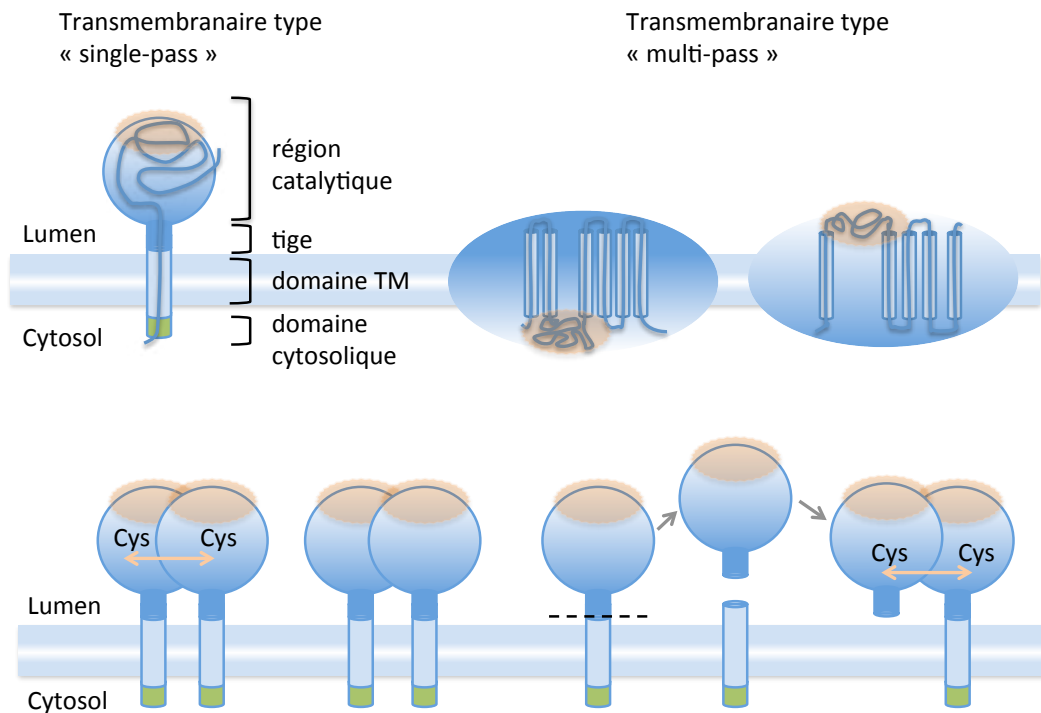


Figure I.22 : Principaux types de GTs golgiennes des plantes d'interactions supposées.

a) A gauche : structure basique d'une GT de type II avec une région cytosolique, une région transmembranaire, une tige et un domaine catalytique. La partie N-ter se situe dans le cytosol et la partie C-ter contenant le domaine catalytique dans la lumière du Gogi. A droite : protéine transmembranaire polytopique avec le site catalytique localisé soit dans le cytosol soit du côté du lumen. b) Différents types d'interactions sont possibles : en dimère par des liaisons faible ou des ponts di-sulfures, et en complexe de plusieurs protéines. c) Mécanisme d'interaction où la première GT de type II perd son ancrage à la membrane pour être retenue par celle avec laquelle elle forme un dimère. Image F. Cicéron, Issu de Ai Oikawa, 2013. DOI : <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2012.07.002>.

De nombreuses interactions protéines-protéines induisent la formation de complexes. Cela contribuerait à la localisation appropriée de certaines GT et serait l'un des facteurs déterminants de la mise en relation de l'enzyme avec son substrat (Hassinen, Rivinoja, Kaupila, & Kellokumpu, 2010 ; Oikawa et al., 2013). Des complexes d'homodimères et d'hétérodimères ont été observés pour des GT impliquées dans la synthèse d'homogalacturonane (M. a. Atmodjo et al., 2011), d'arabinane (Harholt et al., 2012), de glucoarabinoxylane, de xyloglucane, et d'arabinogalactane (Zeng et al., 2010 ; Yi-Hsiang Chou, Pogorelko, & Zabolina, 2012 ; Dilokpimol et al., 2014 ; Lund et al., 2014a ; Y.-H.

Chou, Pogorelko, Young, & Zabolina, 2014). Les bases moléculaires permettant ces interactions, tout comme leur importance biologique, ne sont toutefois encore pas réellement comprises. Les chaînes de glycanes qui s'accumulent dans le Trans-Golgi sont ensuite transportées par des vésicules spécifiques, aux endroits appropriés de la paroi (Worden, Park, & Drakakaki, 2012) (Figure I.23).

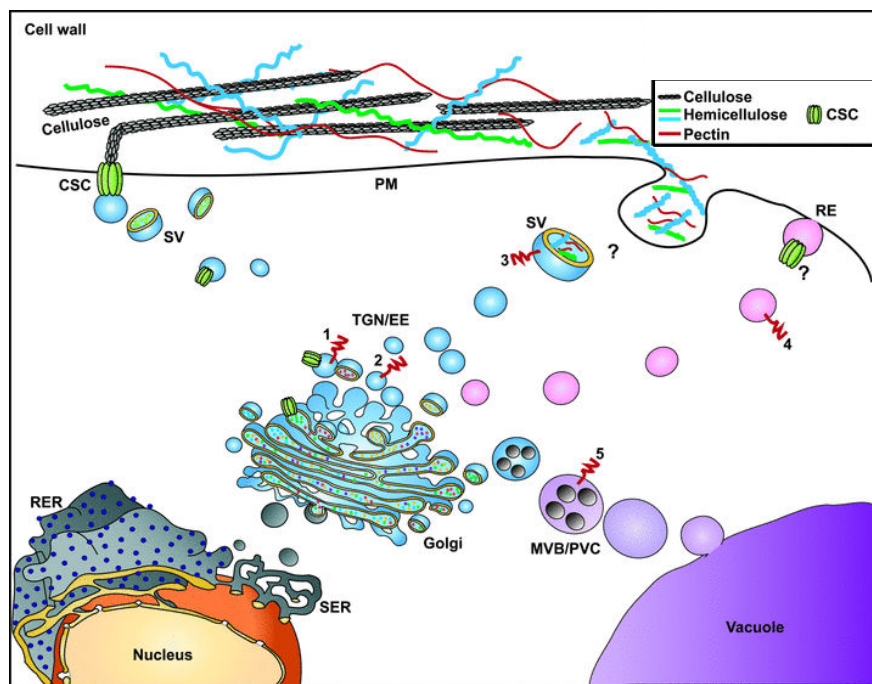


Figure I.23 : représentation simplifiée du trafic membranaire post-Golgi et du dépôt des polysaccharides dans la paroi végétale.

Les complexes de cellulose synthases sont assemblés dans le Golgi et sécrétés à la membrane plasmique. Les hémicelluloses et pectines sont synthétisées dans le Golgi, puis sécrétées au niveau de l'apoplaste où elles sont incorporées à la paroi. Worden, 2012. DOI: 10.1111/j.1744-7909.2012.01179.x

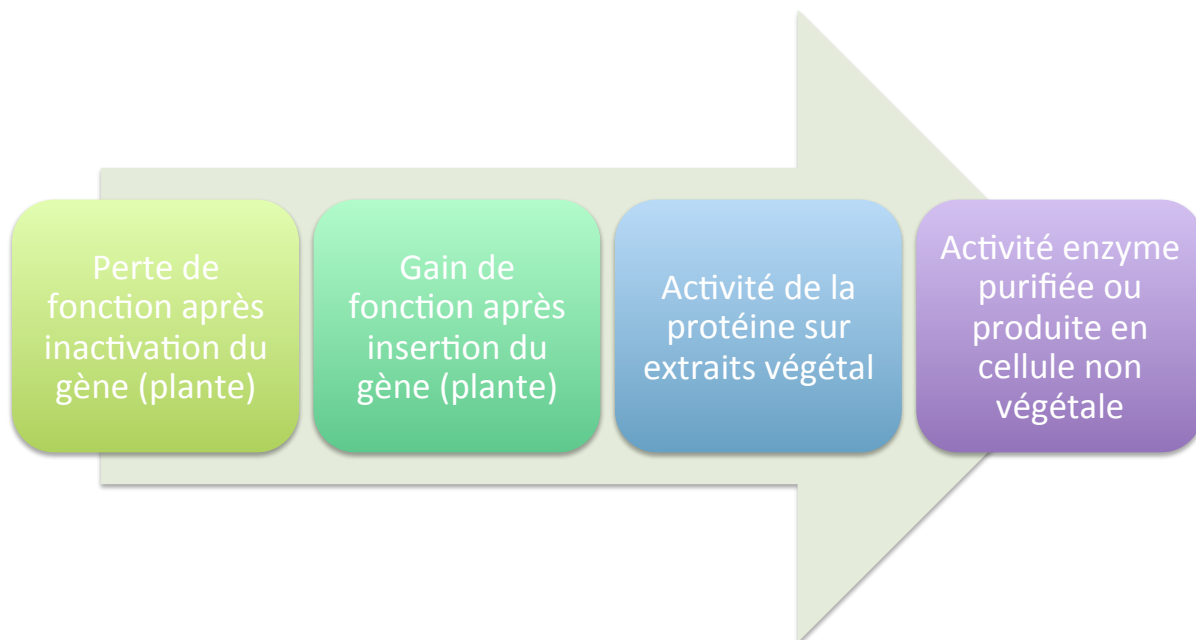
Une batterie d'enzymes : endotransglucosylase/hydrolase, méthyle estérases,... permet alors de les incorporer au réseau de protéines et polysaccharides déjà présents (Wolf et al., 2012 ; Tan et al., 2013).

## I.4. Caractérisation de glycosyltransférases pariétales

### I.4.1. Spécificités et enjeux

La diversité et la complexité de la paroi végétale impliquent nécessairement un nombre important d'enzymes pour la synthèse de ses constituants, leur mise en place et leur régulation (Carpita, 2012). En 2013, la base de données CAZy recense environ 450 gènes d'*Arabidopsis thaliana* codant pour des GTs, répartis en 40 familles distinctes (Lao et al.,

2014 ; Lombard, Golaconda Ramulu, Drula, Coutinho, & Henrissat, 2014). Seulement 20 % de ces séquences ont été annotées. En comparaison, le génome humain ne comporte guère plus de 240 gènes de GT parmi lesquels plus de 80 % étaient annotés en 2012 (Hansen et al., 2009). Ce nombre important de séquences chez la plante est en partie dû aux événements de duplication de génomes, à la glycosylation d'un grand nombre de métabolites secondaires, mais aussi à la synthèse du réseau de glycoprotéines et polysaccharides complexes de la paroi. Il est même probable que ce chiffre soit bien en dessous de la réalité. En effet, la stratégie d'identification de CAZy repose sur la recherche d'homologies de séquences avec des GTs caractérisées dans les génomes séquencés de toutes espèces confondues. Certaines structures de polysaccharides pariétaux sont spécifiques des plantes. Si les séquences codant pour les GTs qui synthétisent ces structures sont trop différentes des séquences déjà connues, ces dernières ne seront pas renseignées sur la base CAZy. Plusieurs études ont ainsi montré que de nombreuses séquences de GTs de plantes ne sont encore pas classées dans cette base de données (Hansen et al., 2009 ; Hansen, Harholt, Oikawa, & Scheller, 2012 ; Voxeur, André, Breton, & Lerouge, 2012). Il reste donc de nombreux gènes de plantes codant pour des GTs, mais dont l'activité de l'enzyme n'a pas été démontré. Cette étape est souvent difficile avec les séquences de plantes, étant donné notamment la grande diversité d'accepteurs potentiels. La [figure I.24](#), explicitée et commentée par quelques exemples dans le paragraphe ci-dessous, reprend les méthodes les plus employées jusqu'alors pour caractériser l'activité GT d'une enzyme végétale.



**Figure I.24 : différentes approches pour la caractérisation d'activité GT.**

Le sens de la flèche indique le niveau de fiabilité de l'approche. La perte de fonction correspond typiquement à la modification de la composition d'un sucre – ou à son absence - suite à l'inactivation du gène d'intérêt. Le gain de fonction peut s'obtenir en exprimant le gène dans une cellule végétale naturellement incapable de faire la réaction suspectée. L'activité sur extrait de végétaux correspond à une démonstration d'activité

après avoir exprimé la protéine et l'avoir partiellement purifiée à partir d'un système d'expression. Dans le dernier cas, la protéine est totalement purifiée, quelque soit le système d'expression, ou son expression se fait dans un système non végétal.

L'approche de génétique inverse analyse l'impact de l'inactivation d'un gène sur le phénotype de la plante. Dans le cas d'un gène impliqué dans la biosynthèse de la paroi, on s'attend le plus souvent à une croissance altérée de la plante et à une modification de la composition en glucides de la paroi. Cette approche est facilitée du fait de l'existence de vastes collections de mutants chez *Arabidopsis*. En revanche, la redondance fonctionnelle des gènes, ainsi que la plasticité de la paroi sont deux caractéristiques des plantes qui limitent fortement cette approche. C'est ainsi que suite à la délétion des deux gènes codant pour la xylosyltransférase du xyloglucane, et à l'absence de ce polysaccharide dans la paroi, les plants d'*Arabidopsis* n'ont montré qu'un faible ralentissement de croissance (Cavalier et al., 2008).

La démonstration d'un gain de fonction est une preuve plus tangible pour identifier la fonction d'un gène candidat. L'exemple suivant en est une démonstration : le polysaccharide  $\beta$ -(1,3 ; 1,4)-glucane n'est pas présent chez *Arabidopsis*, mais principalement dans les céréales. L'équipe de G.B. Fincher a démontré que l'introduction des gènes responsables de la synthèse de ce polysaccharide chez *Arabidopsis* permettait à cette dernière de le synthétiser (Burton et al., 2006 ; Doblin et al., 2009). Il s'agissait dans le cas cité d'une GT processive ne nécessitant pas (visiblement) de structure acceptrice particulière. Dans le cas d'une GT non processive, cette approche nécessite d'exprimer le gène d'intérêt dans un organisme contenant l'accepteur approprié.

La méthode la plus probante pour trouver la fonction d'un gène de GT consiste à démontrer une activité de transfert à partir de l'enzyme exprimée de manière recombinante dans un système d'expression hétérologue. La première difficulté est alors d'obtenir l'enzyme active. Les glycosyltransférases de plantes, comme celles des autres organismes eucaryotes, sont souvent difficiles à produire actives et solubles en bactéries. Il est donc souvent nécessaire d'utiliser un système hétérologue eucaryote tel que la levure, ou les cellules d'insectes. Etant donné la très grande diversité de structures des polysaccharides de la paroi et le nombre important de nucléotide-sucres nécessaires à leur synthèse il en résulte une très grande combinaison d'accepteurs et donneurs à cribler. Ceci explique en partie la faible proportion de gènes pour lesquels une fonction biochimique a été clairement attribuée.

## **I.4.2. Les glycosyltransférases impliquées dans la synthèse du Xyloglucane**

Le xyloglucane (XyG), comme les autres hémicelluloses, est synthétisé dans l'appareil de Golgi (Driouch et al., 2012). La chaîne principale est synthétisée par au moins

une cellulose synthase-like : CSLC4 (Cocuron et al., 2007) (figure I.25). Cette enzyme, à l'instar des autres protéines CSL, comporte plusieurs domaines transmembranaires. Son site actif est situé dans le cytosol (J. Davis, Brandizzi, Liepman, & Keegstra, 2010). Elle utilise l'UDP-Glucose pour synthétiser la chaîne principale, puis transfère cette dernière dans le lumen à travers la membrane de l'appareil de Golgi. Exprimée de manière recombinante dans la levure, CSLC4 est davantage active si la xylosyltransférase (XXT1) est co-exprimée. Pourtant cet organisme ne possède pas d'UDP-xylose et aucun xylose n'est alors détecté sur le glucane. L'activité de CSLC4 dépend donc de la présence de XXT1, mais pas nécessairement de son activité. Toutes les autres GTs impliquées dans les décorations de cette chaîne principale sont de type II avec le domaine catalytique exposé dans le lumen (Søgaard et al., 2012).

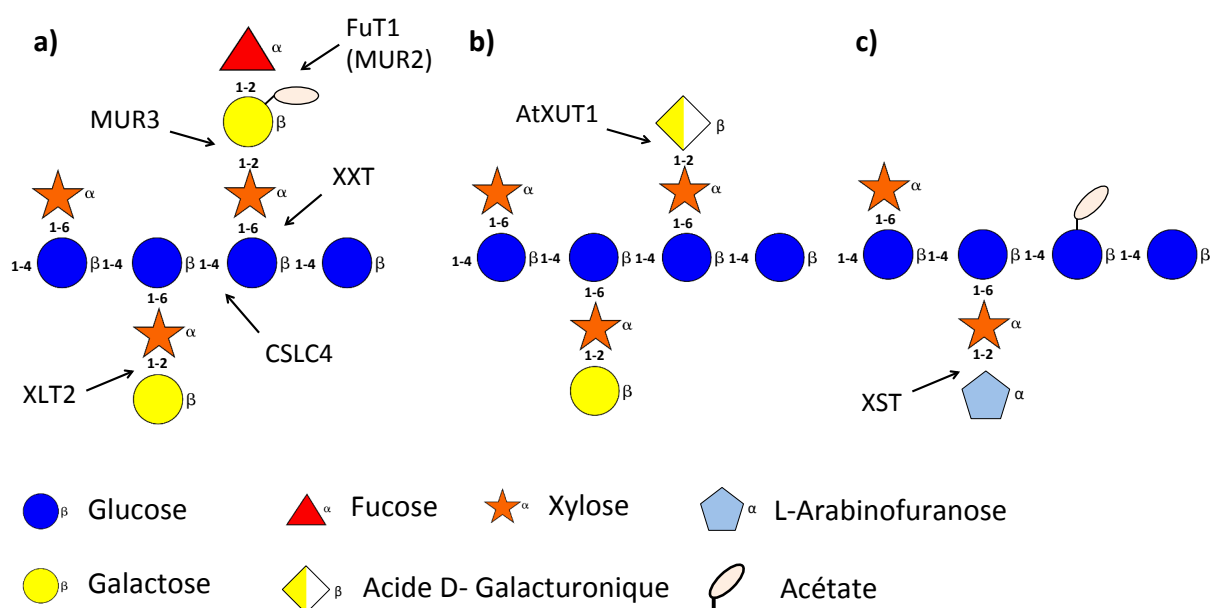


Figure I.25 : Glycosyltransférases identifiées de la synthèse de xyloglucane

a) fragments de XyG de la paroi végétale d'un organe aérien (tube pollinique, tige, feuille) d'*A. thaliana*, comportant un groupement fucose : XLFG. b) Motif retrouvé dans les racines d'*A. thaliana*, avec un acide galacturonique à la place du galactose : XLZG. c) Motif présent chez les *Solanaceae* (monocot) avec un arabinose remplaçant un galactose : XSGG. (Image F. Cicéron)

Le mécanisme gouvernant la xylosylation est encore mal compris. Plusieurs xylosyltransférases ont été identifiées et toutes appartiennent à la famille GT34. Ces xylosyltransférases sont référencées par les lettres XXT, suivi du chiffre 1 à 5. XXT1 est la première à avoir été identifiée et caractérisée (Faik, Price, Raikhel, & Keegstra, 2002). Par la suite les activités XyG- $\alpha$ 6-XylT de XXT1 et XXT2 produites en cellules d'insecte puis de celle de XXT4 en bactérie ont été confirmées (Cavalier & Keegstra, 2006 ; Vuttipongchaikij et al., 2012). Les gènes codants pour XXT3 et XXT5 ont été caractérisés indirectement *in-planta*, par des délétions et restaurations de fonctions (Cavalier et al., 2008 ; Vuttipongchaikij et al., 2012).

L'ajout des résidus galactoses, lorsqu'il a lieu, est effectué par deux  $\beta$ -1,2 galactosyltransférases distinctes de la famille GT47: XLT2 ajoute un galactose sur le second résidu de xylose et MUR3 sur le troisième (Madson et al., 2003 ; Jensen, Schultink, Keegstra, Wilkerson, & Pauly, 2012). Deux autres sucres peuvent être observés à la place du galactose : un acide galacturonique dans les racines d'*A. thaliana*, ou un arabinose chez les tomates et autres espèces de *Solanaceae* (Ring & Selvendran, 1981 ; Hoffman et al., 2005) (Figure I.25 b et c, respectivement). L'acide galacturonique est ajouté avec une liaison  $\alpha$ 1,2 sur un résidu Gal par AtXUT1 de la famille GT47 (Pena et al., 2012). Deux gènes codant pour des arabinosyltransférases ont été identifiés chez la tomate : XST1 et XST2 (GT47). Exprimés dans des mutants d'*Arabidopsis* dépourvus de galactosyltransférase du xyloglucane, ces derniers ont induit la présence de XyG arabinosylé, une structure jamais observée précédemment chez cette plante. Ils ont aussi permis de restaurer les phénotypes biomécaniques et de croissance, montrant la flexibilité en termes de type de résidus présents dans les chaînes latérales de ce polymère (Side et al., 2013). Une seule fucosyltransférase permettant l'ajout d'un fucose terminal sur le deuxième galactose a été identifiée à ce jour. Il s'agit de l' $\alpha$ -1,2 fucosyltransférase (AtFuT1) de la famille GT37 (Robyn M Perrin et al., 1999 ; Faik, Barpeled, et al., 2000). Deux hypothèses existent concernant le procédé d'ajout des groupements latéraux : ils seraient soit greffés au fur et à mesure de la progression de la chaîne principale à travers les compartiments du Golgi (Chevalier et al., 2010), soit au sein de complexes multi-protéiques, regroupant l'ensemble des enzymes impliquées (Lund et al., 2014b ; Y.-H. Chou et al., 2014). Cette deuxième hypothèse est représentée dans la figure I.26.

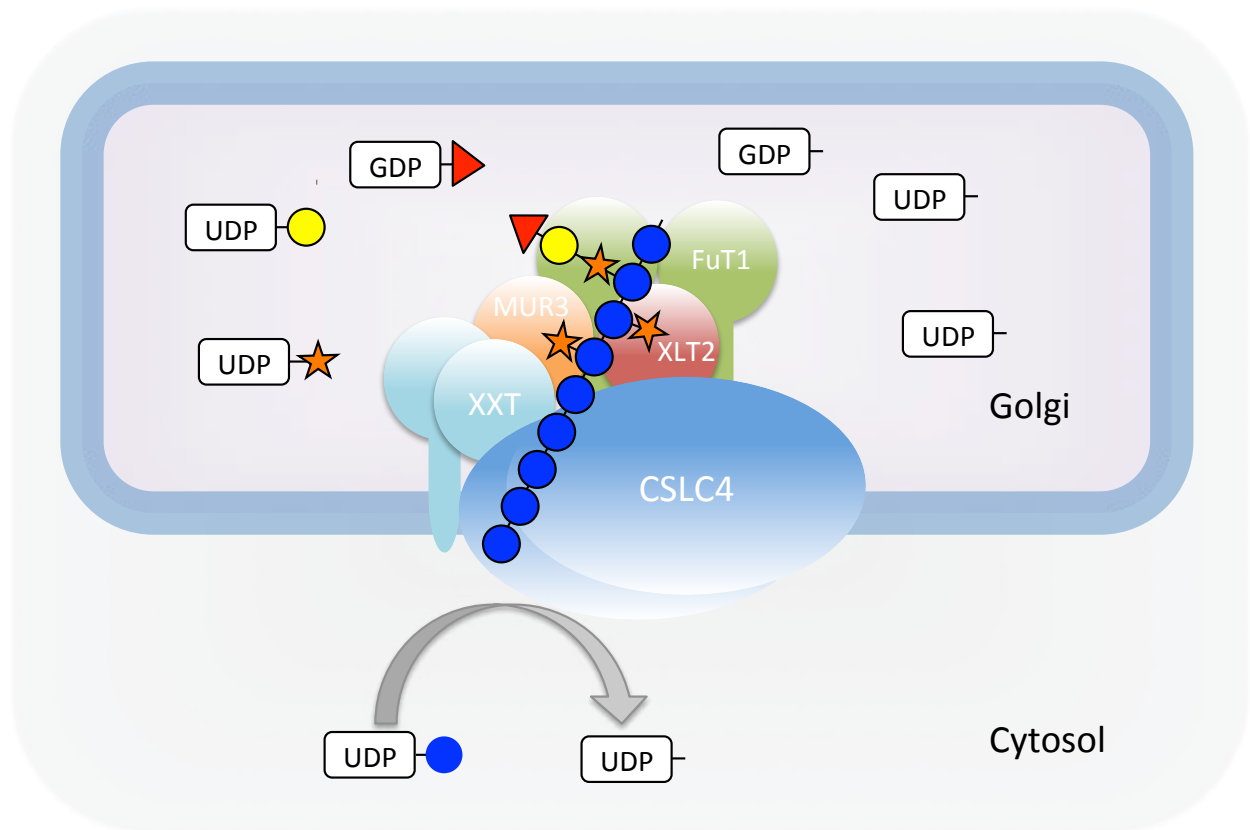


Figure 1.26 : Modèle prédominant de la biosynthèse du xyloglucane au niveau de l'appareil de Golgi.

Les sphères contenant des tiges représentent les GT de type II et les ovales représentent CSLC4. Dans ce modèle, les glycosyltransférases impliquées agiraient en complexes. Il a été montré que ces protéines interagissent entre elles, mais leurs positions exactes les unes par rapport aux autres sont inconnues. Les GTs CSLC4, XXT et FuT1 formeraient des homodimères (Chou, 2014). (Image F. Cicéron).

La compartimentation des GTs impliquées dans la synthèse des chaînes latérales a été suggérée suite à différentes observations microscopiques du Golgi, contenant les GTs AtXT1, AtMUR3 et AtFuT1 couplées à la GFP. AtXT1-GFP est apparue principalement dans la partie *cis* et médiane du Golgi, AtMUR3-GFP dans la partie médiane et AtFuT1-GFP dans la partie *trans*. Par la suite, la formation de complexes a d'abord été montrée entre CSLC4 et XXT1, XXT2, XXT5 puis aussi avec MUR3 et FuT1. Au sein de ces complexes, AtFuT1 formerait des homo-dimères par des ponts di-sulfures et interagirait directement, de manière non covalente, avec MUR3 et XXT2 ou XXT5.

Les fragments transportés en sortie de l'appareil de Golgi seraient de petites tailles – environ 9 kDa (Thompson, Smith, & Fry, 1997) et fucosylés sur tous les sites accepteurs de FuT1 (Gunl et al., 2011). Ensuite, des endo-transglucosidases / hydrolases présentes dans la paroi interviendraient pour former des chaînes plus longues, de 100 - 300 kDa, enchevêtrées avec les autres composants matriciels (Park & Cosgrove, 2015). Une  $\alpha$ -fucosidase agirait aussi au niveau de la paroi pour défucosyler certaines positions du xyloglucane, induisant davantage d'hétérogénéité dans la molécule (Günl & Pauly, 2011).

### **I.4.3. *Arabidopsis thaliana* fucosyltransférase 1 (AtFuT1)**

AtFuT1 transfère un fucose à partir du donneur Guanidine-di-phosphate-fucose (GDP-Fuc) sur un résidu terminal de galactose du xyloglucane, en  $\alpha$ 1-2. FUT1 est la première GT impliquée dans la synthèse d'hémicellulose à avoir été purifiée et partiellement caractérisée biochimiquement. La première extraction a été faite à partir de microsomes de pois, en 1991 (Hanna et al., 1991). Le séquençage de la protéine purifiée a ensuite permis d'identifier le gène codant cette séquence chez *A. thaliana*. Puis, son expression en cellules de mammifère a permis de confirmer son activité de transfert de fucose sur du xyloglucane (Robyn M Perrin et al., 1999). Par la suite, ses paramètres biochimiques ont été précisément décrits, toujours après purification à partir de microsome de pois (Faik, Bar-peled, et al., 2000). Le test de radioactivité alors mis au point pour la mesure de l'activité est toujours utilisé à ce jour. Il s'agit de mesurer un transfert de fucose radio-marqué par du  $^3\text{H}$  ou du  $^{14}\text{C}$  à partir de GDP-Fuc, sur du xyloglucane de graine de tamarin (Faik, Bar-peled, et al., 2000). L'absence d'oligosaccharide de xyloglucane fucosylé chez le mutant *Fut1* d'*Arabidopsis* a permis de montrer que l'activité FucT du XyG est sous le contrôle de ce seul gène (Lerouxel et al., 2002 ; Vanzin et al., 2002 ; Robyn M Perrin et al., 2003 ). La découverte de la fonction de AtFuT1 est à l'origine de la création de la famille GT37 dans CAZy. En 2015, cette famille contient 57 séquences toutes issues de plantes, dont 10 séquences d'*Arabidopsis* annotées de FuT1 à FuT10. Seules 3 d'entre elles (FuT1, FuT4 et FuT6) ont été caractérisées biochimiquement à ce jour. FuT4 et FuT6 sont aussi des FucT qui transfèrent un fucose en alpha 1,2 mais sur les AGP (arabinogalactanes protéines) (Wu et al., JBC 2010, (Liang et al., 2013).

Il n'y a à ce jour aucune structure 3D connue pour la famille GT37. Cependant, il est à noter que les séquences de cette famille possèdent des motifs peptidiques communs à ceux décrits pour d'autres FucTs appartenant aux familles GT23, GT65 et GT68 (Chazalet, Uehara, Geremia, & Breton, 2001 ; Martinez-Duncker, 2003), familles pour lesquelles des structures ont été résolues. Sur la base de ces motifs, il a été prédit que ces 4 familles adopteraient un repliement de type GT-B (Breton, Šnajdrová, Jeanneau, Koča, & Imberty, 2006 ; Breton et al., 2012).

## **I.5. Objectifs de ce doctorat**

Les glycosyltransférases de la paroi végétale présentent plusieurs particularités qui rendent leur identification et leur caractérisation complexe. Elles sont difficiles à produire actives et solubles de manière recombinante, et déterminer leurs substrats nécessite de cribler un grand nombre de structures d'accepteurs et de donneurs. Cette limitation liée au criblage représente une contrainte importante dans notre laboratoire, qui bénéficie en revanche d'un panel varié de systèmes d'expression de protéine.

Comme mentionné précédemment, la caractérisation de GTs de la paroi végétale apporte des informations biologiques sur la manière dont se constitue ce matériaux complexe, ainsi que de potentiels « outils enzymatiques » pour diverses applications à moyen terme. Enfin, aucune donnée structurale n'est actuellement disponible pour les GTs impliquées dans la synthèse d'hémicellulose ou de pectine. Pourtant, obtenir les structures de ces enzymes et identifier précisément leurs sites catalytiques aiderait à comprendre les bases de leurs spécificités ainsi que leurs mécanismes d'action.

Le processus de synthèse d'un polysaccharide complexe tel que le xyloglucane au sein de l'appareil de Golgi est encore mal compris. Les approches principalement utilisées pour disséquer ce mécanisme combinent des techniques marquages de protéines de fusion pour des observations principalement *in-cellulo* (Chevalier et al., 2010 ; Y.-H. Chou, Pogorelko, & Zabolina, 2012 ; Y.-H. Chou et al., 2014). Ces dernières permettent de montrer que les GTs impliquées agissent en complexes enzymatique, mais ne suffisent pas à conclure sur la manière dont se font les interactions, entre elles ou avec le xyloglucane. Produire et purifier ces enzymes en quantité suffisamment importante permettraient d'investiguer ce procédé *in-vitro*, étape par étape, avec uniquement les composés d'intérêt. Nous avons choisi d'entreprendre la cristallisation et l'étude cristallographique d'AtFuT1. Il s'agit de la première séquence de GT impliquée dans la synthèse du xyloglucane à avoir été découverte et l'une des plus étudiées. Un seul gène a pour le moment été identifié comme codant cette fonction. Il est suffisamment différent des autres séquences jusqu'alors connues pour avoir induit la création d'une nouvelle famille (GT-37) au sein de la base de donnée CAZy. Au sein de cette famille, il est jusqu'alors le seul dont la fonction soit précisément identifiée. Cette particularité de la séquence primaire permet de s'attendre à observer quelques variations structurales, par rapport aux autres GT dont les structures sont résolues. Enfin, la fucosylation chez les eucaryotes est impliquée dans de nombreux procédés biologiques, notamment dans le développement de l'embryon - l'angiogenèse de manière générale, l'adhésion des cellules, l'athérosclérose, etc. (Ma, Simala-Grant, & Taylor, 2006 ; Miyoshi et al., 2012 ; Pu & Yu, 2014 ; Tu, Lin, & Lin, 2013). Dans ces domaines, toute nouvelle résolution de structure peut apporter des informations intéressantes pour le criblage de donneur analogue, ou l'ingénierie de structure. Au laboratoire, la disponibilité de cette fucosyltransférase purifiée pourrait permettre de fucosyler *in-vitro* du galactoxyloglucane issu de graines de tamarin. Cela permettrait d'étudier le rôle de la fucosylation de ce polymère pour ses propriétés rhéologiques. Les objectifs de ce travail sont : 1) d'utiliser AtFuT1 pour mettre au point des tests innovants de criblage et de mesures d'activités GTs adaptés aux équipements de notre laboratoire ou de nos collaborateurs, et 2) d'obtenir des données biochimiques et structurales sur AtFuT1 qui serviront, par la suite, à caractériser son mécanisme réactionnel et les interactions effectuées avec ses substrats. Pour atteindre ces objectifs, l'enzyme est produite dans un système d'expression hétérologue et purifiée en deux étapes. Les produits de cette

purification ont été caractérisés par différentes méthodes biochimiques, afin de savoir dans quelles conditions l'enzyme peut être utilisée. Enfin, la quasi-totalité de la protéine purifiée a servi à identifier des conditions de cristallisation puis à produire des cristaux, afin de résoudre sa structure à partir de données uniquement expérimentales.



---

## **Chapitre II : Production d'AtFuT1 en système hétérologue**

---



## II. Production d'AtFuT1 en système hétérologue

### II.1. Analyse bioinformatique et tests préliminaires

#### II.1.1. Observations de la séquence primaire

Le génome d'*Arabidopsis thaliana*, la plante « modèle » en biologie végétale, a été intégralement séquencé par l'*Arabidopsis Genome Initiative* (AGI) en 2000 et les séquences codantes sont disponibles sur la base de données du site TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>). Le gène codant AtFuT1 est situé sur le 2<sup>e</sup> chromosome, locus AT2G03220, et comporte l'ensemble des noms suivants utilisés dans la littérature : ARABIDOPSIS THALIANA FUCOSYLTRANSFERASE 1, ATFT1, ATFUT1, FT1, FUCOSYLTRANSFERASE 1, FUT1, MUR2, MURUS 2. La séquence d'AtFuT1 est classée dans la famille GT37 de CAZy. Aujourd'hui, la disponibilité d'outils bioinformatiques variés permet d'obtenir des informations intéressantes à partir de la séquence de sa protéine d'intérêt. L'analyse de la séquence d'AtFuT1 a été un préalable important permettant de cerner les caractéristiques de notre protéine et d'envisager au mieux la construction à produire de manière recombinante. Dans un premier temps nous avons cherché à prédire la structure 3D de la protéine AtFuT1 en utilisant le serveur PHYRE2 (*Protein Homology/analogY Recognition Engine* ; <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>). La séquence est criblée contre une base de données comportant 10 millions de séquences protéiques (PSI-BLAST), afin de rechercher celles présentant des homologies de séquence. Un modèle 3D est alors construit pour la protéine d'intérêt à l'aide d'un modèle statistique (« Hidden Markov Model ») et à partir de chaque séquence homologue dont la structure est résolue. Cette combinaison de techniques permet de créer des modèles fiables, à partir de séquences primaires en acides aminés présentant des similarités inférieures à 15% (Soding, Biegert, & Lupas, 2005 ; Jefferys, Kelley, Sergot, Fox, & Sternberg, 2006), (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/>). Concernant AtFuT1, quatre des cinq fucosyltransférases cristallisées sont retenues par le logiciel PHYRE2 et permettent de créer un modèle avec un taux de confiance élevé, malgré des pourcentages d'identité moyens (de 15 à 20 %). Il s'agit de : la fucosyltransférase NODZ issue de la bactérie *Bradyrhizobium* (Brzezinski et al., 2007), la FUT8 humaine (Ihara et al., 2007), la POFUT1 de *C. elegans* (Lira-Navarrete et al., 2011) et la POFUT2 humaine (Chen et al., 2012) (Figure I.1).

Ces résultats confirment la prédiction effectuée auparavant au laboratoire, qu'AtFuT1 adopte un repliement de type GT-B (Chazalet et al., 2001 ; Martinez-Duncker, 2003).

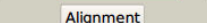
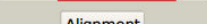
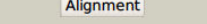
| # | Template               | Alignment Coverage                                                                          | 3D Model                                                                          | Confidence | % i.d. | Template Information                                                                                                                                                                                                      |
|---|------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|------------|--------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 | <a href="#">c2hlhA</a> |  Alignment |  | 100.0      | 18     | <b>PDB header:</b> transferase<br><b>Chain:</b> A; <b>PDB Molecule:</b> nodulation fucosyltransferase;<br><b>PDBTitle:</b> crystal structure of fucosyltransferase nodz from bradyrhizobium                               |
| 2 | <a href="#">c2de0X</a> |  Alignment |  | 99.7       | 21     | <b>PDB header:</b> transferase<br><b>Chain:</b> X; <b>PDB Molecule:</b> alpha-(1,6)-fucosyltransferase;<br><b>PDBTitle:</b> crystal structure of human alpha 1,6-fucosyltransferase, fut8                                 |
| 3 | <a href="#">c3zy6A</a> |  Alignment |  | 99.1       | 15     | <b>PDB header:</b> transferase<br><b>Chain:</b> A; <b>PDB Molecule:</b> putative gdp-fucose protein o-fucosyltransferase 1;<br><b>PDBTitle:</b> crystal structure of pofut1 in complex with gdp-fucose2 (crystal-form-ii) |
| 4 | <a href="#">c4ap6C</a> |  Alignment |  | 98.4       | 15     | <b>PDB header:</b> transferase<br><b>Chain:</b> C; <b>PDB Molecule:</b> gdp-fucose protein o-fucosyltransferase 2;<br><b>PDBTitle:</b> crystal structure of human pofut2 e54a mutant in complex with gdp-2 fucose         |

Figure II.1 : analyse de la séquence AtFuT1 sur le serveur PHYRE2

Quatre protéines identifiées par le serveur PHYRE2 permettent de construire un modèle pour d'AtFuT1. Les différentes colonnes représentent l'étendue de la séquence d'AtFuT1 utilisée pour construire le modèle, le niveau de confiance associé et le pourcentage d'identité de la portion utilisée.

L'alignement de la séquence d'AtFuT1 à celles des autres fucosyltransférases caractérisées permet de prédire la portion de la séquence primaire où se trouve probablement le domaine catalytique d'AtFuT1. Le début du domaine catalytique (à savoir le domaine Rossmann N-terminal typique des enzymes de type GT-B) fut estimé autour de la position 170. D'autres sites permettent d'obtenir des informations importantes sur une protéine. Notamment, les serveurs TMMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMMHMM/>) et HMMTOP (<http://www.enzim.hu/hmmtop/>) prédisent les domaines transmembranaires d'une séquence à partir des propriétés des acides aminés et de la présence de peptide signal. Pour AtFuT1, les deux sites mentionnés font état d'un domaine transmembranaire, entre les résidus 41 à 63 et 45 à 62, respectivement. Les deux estimations sont concordantes et la séquence correspondante (41 à 63, la plus large) est sur-brillée en vert sur la [figure II.2](#). Cela confirme que AtFuT1 adopte la topologie classique des GTs golgiennes, à savoir une topologie membranaire de type II ([Figure I.2](#)).



```

1 MDQNSYRRRS SPIRTTTGGS KSVNFSELLQ MKYLSSGTMK LTRTFTTTCLI
51 VFSVLVAFSM IFHQHPSDN RIMGFAEARV LDAGVFPNVT NINSDKLLGG
101 LLASGFDEDS CLSRYQSVHY RKPSYPKPSS YLISKLRNYE KLHKRCGPGT
151 ESYKKALKQL CQEHIDGDGE CKYVVWISFS GLGNRISLA SVFLYALLTD
201 RVLLVDRGKD MDDLFCEPFL GMSWLLPLDF PMTDQFDGLN QESSRCYGYM
251 VKNQVIDTEG TLSHLYLHLV HDYGDHDKMF FCEGDQTFIG KVPWLIVKTD
301 NYFVPSLWLI PGFDDELNKL FPQKATVFHH LGRYLFHPTN QVWGLVTRYY
351 EAYLSHADEK IGIQVRVFDE DPGPFQHVMD QISSCTQKEK LLPEVDTLVE
401 RSRHVNTPKH KAVLVTSLNA GYAENLKSMY WEYPTSTGEI IGVHQPSQEG
451 YQQTEKKMHN GKALAEMYLL SLTDNLVTSA WSTFGYVAQG LGGLKPWILY
501 RPENRTTPDP SCGRAMSMEP CFHSPPFYDC KAKTGIDTGT LVPHVRHCED
551 ISWGLKLV

```

Figure II.2 : séquence primaire d'AtFuT1. Chaîne d'acides aminés issue de l'ADNc disponible sur la ressource "TAIR"

- **NxS/T** sites prédits de N-glycosylation
- **F** partie prédite transmembranaire
- **S<sub>69</sub> S<sub>94</sub>, D<sub>161</sub>** premiers acides aminés des constructions AtFuT1<sub>Δ68</sub> AtFuT<sub>Δ93</sub> et AtFuT<sub>Δ160</sub>
- **KYV,...,RPENR**. Domaine initialement estimé au laboratoire à partir des alignements de séquences
- **C**: cystéine

GlycoEp (<http://www.imtech.res.in/raghava/glycoep/submit.html>) et NetGlyc (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) ont été utilisés pour la prédiction de sites de N-glycosylation. Le premier est destiné à toute protéine eucaryote et le deuxième est conçu pour les protéines humaines. Tous deux identifient trois sites présentant une forte probabilité de N-glycosylation. Le premier site (N24) est situé dans la partie N-ter cytosolique de la protéine. Le deuxième est dans la partie prédite dans la région tige (N88) et le troisième (N504) vers la fin du domaine catalytique. La séquence de AtFuT1 comprend 12 résidus cystéine. Le serveur DiANNA qui combine l'utilisation de plusieurs programmes pour prédire l'existence de ponts disulfures entre les cystéines d'une protéine a également été utilisé pour analyser AtFuT1 (Ferrè & Clote, 2005). Six ponts disulfures sont prédits avec la séquence de AtFuT1, tous avec un score supérieur à 0,98. D'après cette prédiction, chaque cystéine est impliquée dans une liaison covalente. De manière générale, il est aussi informatif d'observer le degré de conservation des cystéines au sein de la séquence primaire des protéines les plus homologues. Un alignement entre AtFuT1 et quinze autres protéines de la famille GT37 montre que 10 des 12 cystéines sont globalement très conservées (annexe 1).

De manière à produire la protéine active et soluble, il apparaît préférable d'effectuer une troncation dans la région stem, entre la fin de la partie transmembranaire et le début du domaine catalytique (Figure II.2).

## II.1.2. Expression de formes tronquées d'AtFuT1

Les tests d'expression et d'activité d'AtFuT1 ont été initiés avant le début de ce doctorat. La production de la protéine sous forme tronquée a été mise en œuvre au laboratoire par Mme Valérie Chazalet. Deux constructions ont été réalisées par Mme Valérie Chazalet dans le système baculovirus/cellules d'insectes, afin de produire la protéine sous forme tronquée soluble. Ces formes tronquées appelées AtFuT1 $_{\Delta 68}$  et AtFuT1 $_{\Delta 160}$  correspondent aux délétions de 68 et 159 résidus à partir de l'extrémité N-terminale. Le vecteur utilisé : pVT-Bac-His permet de produire la protéine dans le surnageant de culture avec une étiquette (His)<sub>6</sub> en position N-terminale (Cf [Matériels & Méthodes](#)). C'est la fusion de la protéine avec le peptide signal de la mélittine qui permet la sécrétion de la protéine et l'ajout des modifications post traductionnelles eucaryotes. La construction ADN utilisée pour AtFuT1 $_{\Delta 68}$  est donnée dans la [figure II.3](#).

atgcgggggttctcatcatcatcatcatcatgggatggctagcatgactgggtggacagcaa  
 M R G S H H H H H H G M A S M T G G Q Q  
 atggggtcgggatctgtacgacgatgacgataagcttagactgcagtcgaatcggattatg  
 M G R D L Y D D D D K S R L Q S N R I M  
 ggttttcgccgaagctagagttctcgcacgccggagttttcccaaatgttactaacatcaat  
 G F A E A R V L D A G V F P N V T N I N  
 tctgataagcttctcggagggctacttgcttctggttttgatgaagattcttgccttagt  
 S D K L L G G L L A S G F D E D S C L S  
 aggtaccaatcagttcattaccgtaaaccttcaccttacaagccatcttcttatctcatc  
 R Y Q S V H Y R K P S P Y K P S S Y L I  
 tctaagcttagaaaactacgaaaagcttcacaagcgatgtgggtccgggtactgaatcttac  
 S K L R N Y E K L H K R C G P G T E S Y  
 aagaaagctctaaaacaacttgatcaagaacatattgatgggtgatggatgaatgcaaatat  
 K K A L K Q L D Q E H I D G D G E C K Y  
 gttgtgtggattttcttttagcggcttagggaacaggatactttctctagcctcggttttt  
 V V W I S F S G L G N R I L S L A S V F  
 ctttacgcgcttttaacggatagagtcttgcttggtgaccgagggaaagacatggatgat  
 L Y A L L T D R V L L V D R G K D M D D  
 ctcttttgcgagccgtttctcgggtatgtcgtgggtgtaccttttagatttccctatgact  
 L F C E P F L G M S W L L P L D F P M T  
 gatcagtttgatggattaaatcaagaatcatctcgttggttatggatatatggatgaagaat  
 D Q F D G L N Q E S S R C Y G Y M V K N  
 caggtgattgatactgagggaaactttgtctcatctttatcttcatcttggtcatgattat  
 Q V I D T E G T L S H L Y L H L V H D Y  
 ggagatcatgataagatgttcttctgtgaaggagaccaaacattcatcgggaaagtccct  
 G D H D K M F F C E G D Q T F I G K V P  
 tggttgattgttaaaacagacaattactttgttccatctctgtggttaataaccgggtttc  
 W L I V K T D N Y F V P S L W L I P G F  
 gatgatgaactaaacaagctattcccacagaaagcgactgtctttcatcacttaggtagg  
 D D E L N K L F P Q K A T V F H H L G R  
 tatctttttcacccaactaaccaagtatggggcttagtgcactagatactacgaagcttac  
 Y L F H P T N Q V W G L V T R Y Y E A Y  
 ttatcgcgatcgggatgagaagattgggattcaagtaagagttttcgcgatgaagaccgggt  
 L S H A D E K I G I Q V R V F D E D P G  
 ccatttcagcatgtgatggatcagatttcattctgtactcaaaaagagaaacttctacct  
 P F Q H V M D Q I S S C T Q K E K L L P  
 gaagtagacacactagtggagagatctcgcgatgttaataacccccaaacacaaagccgtg  
 E V D T L V E R S R H V N T P K H K A V  
 cttgtcacatctttgaacgcgggttacgcggagaacttaagagtatgtattgggaatat  
 L V T S L N A G Y A E N L K S M Y W E Y  
 ccgacatcaactggagaaatcatcgggtgttcacagccgagccaagaaggttatcagcag  
 P T S T G E I I G V H Q P S Q E G Y Q Q  
 accgaaaaaaagatgcataatggcaaagctcttgcggaatgtatcttttgagtttgaca  
 T E K K M H N G K A L A E M Y L L S L T  
 gataatcttgtgacaagtgttggtctacatttgatgtatgtagctcaaggcttggaggt  
 D N L V T S A W S T F G Y V A Q G L G G  
 ttaaagccttgatactctatagaccgaaaacggtacaactcccgatccttcgtgtggt  
 L K P W I L Y R P E N R T T P D P S C G  
 cgggctatgtcgtatggagccttggttccactcgcctccattctatgattgtaaagcgaaa  
 R A M S M E P C F H S P P F Y D C K A K  
 acgggtattgacacgggaacactagttcctcatgtgagacattgtgaggatatcagctgg  
 T G I D T G T L V P H V R H C E D I S W  
 ggacttaagctagtatgagaattc  
 G L K L V - E F

Figure II.3 : ADN codant et protéine correspondante à AtFuT1<sub>Δ68</sub>, clonée dans le vecteur pVT-Bac-His.

Séquences représentées à partir du codon start suivant immédiatement le peptide signal de la mélittine et jusqu'au site EcoRI, ajouté après le codon stop. Sur l'étiquette, le tag (His)<sub>6</sub> est en bleu, le site de l'entérokinase en magenta et l'ensemble du site reconnu par l'anticorps X-Press est sur-brillé en gris. Les deux sites de clonages sont surlignés en cyan (PstI) et jaune (EcoRI). Le premier acide aminé de la séquence clonée est surligné en rouge (la sérine) et les deux sites potentiels de glycosylation sont en rouge (N) et bleu. Les résidus conservés entre séquences de la même famille sont présentés en annexe I.

La figure II.4 montre les résultats d'expression obtenus dans deux milieux de culture (ExCell 405 et Express-five) et les tests d'activité réalisés par mesure de l'incorporation de fucose radiomarqué sur l'accepteur xyloglucane (XyG). De ces tests préliminaires, il apparaît que la forme tronquée à -160 est très faiblement produite et de plus inactive, contrairement à la forme tronquée à -68. Plusieurs hélices  $\alpha$  sont prédites dans la région 100-170 en amont du domaine catalytique prédit par PHYRE2. Ces résultats suggèrent que cette région (au moins en partie) est nécessaire à la stabilité et à la fonction de AtFuT1.

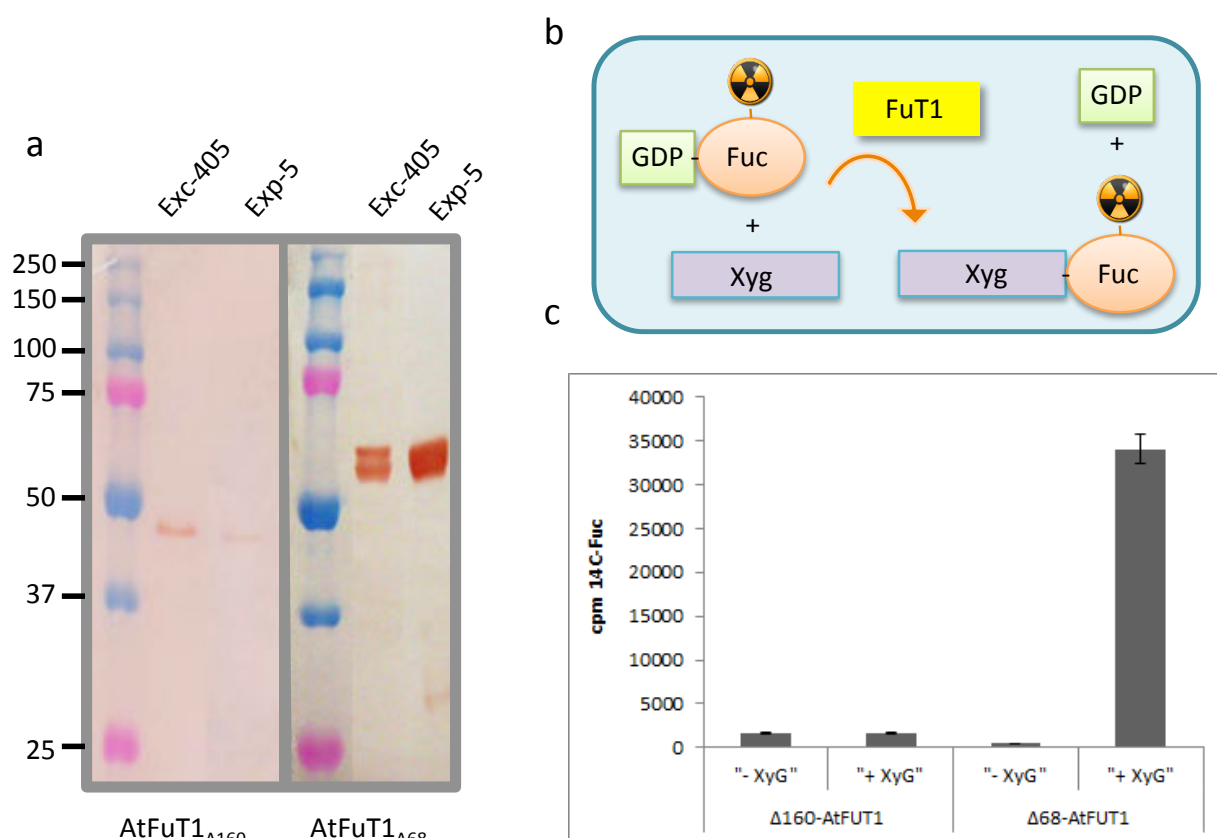


Figure II.4 : expression hétérologue de deux constructions d'AtFuT1 tronquée en système baculovirus/cellules d'insectes.

a) Détection par Western Blot des protéines sécrétées par l'anticorps anti-His-tag. Deux milieux de culture : Ex-Cell 405 ou Express-five ont été testés. b) Principe du test radioactif utilisé pour mesurer l'activité de transfert du fucose sur le xyloglucane (XyG). c) Dosage de l'activité des formes tronquées de AtFuT1. Le test mesure l'incorporation de résidus fucose radiomarqué sur du xyloglucane. « -XyG », contrôle en absence de xyloglucane.

Ces dernières années, un certain nombre de GTs eucaryotes ont pu être produites avec succès chez *Escherichia coli* ([cf introduction](#)). A l'issue de ces tests préliminaires, il a été décidé de tenter l'expression chez *E. coli*. L'avantage principal du système d'expression en bactérie réside notamment dans la capacité de production qui correspond aux besoins nécessaires pour les différentes études biochimiques envisagées et notamment la cristallisation.

## II.2. Expression de AtFuT1 chez *Escherichia coli*

La stratégie utilisée ici a été d'utiliser différents plasmides et souches de bactéries, en variant les conditions d'expression. L'objectif a été de trouver un système permettant d'obtenir la protéine soluble et active.

Deux séquences ont été amplifiées par PCR à partir du plasmide pVT-Bac-His\_AtFuT1 $\Delta$ 68 et clonées dans différents plasmides. Ces deux séquences sont AtFuT1 $\Delta$ 68 (construction démontrée active lorsque produite en cellules d'insecte) et AtFuT1 $\Delta$ 93. Cette deuxième délétion présente une tige plus courte. La portion de séquence enlevée [68 à 93] est prédite non structurée (PHYRE2) et permet d'éliminer aussi un site potentiel de N-glycosylation (N88).

### II.2.1. Variations de conditions d'induction et de solubilisation

Les premiers essais ont été réalisés avec les plasmides pET-TEV- AtFuT1 $\Delta$ 68 et pET-TEV- AtFuT1 $\Delta$ 93 et les cellules BL21 (DE3) classiquement utilisées avec un plasmide comportant un promoteur inductible par IPTG. Les résultats de ces premiers tests sont présentés dans la [figure II.5](#). Les bactéries ont été cultivées soit à 30°C, soit à 37 °C après induction par l'IPTG (1 mM). Des prélèvements à différents temps ont été effectués pour suivre la quantité de protéine obtenue, puis l'ensemble des bactéries ont été lysées pour séparer par centrifugation les fractions solubles et insolubles.

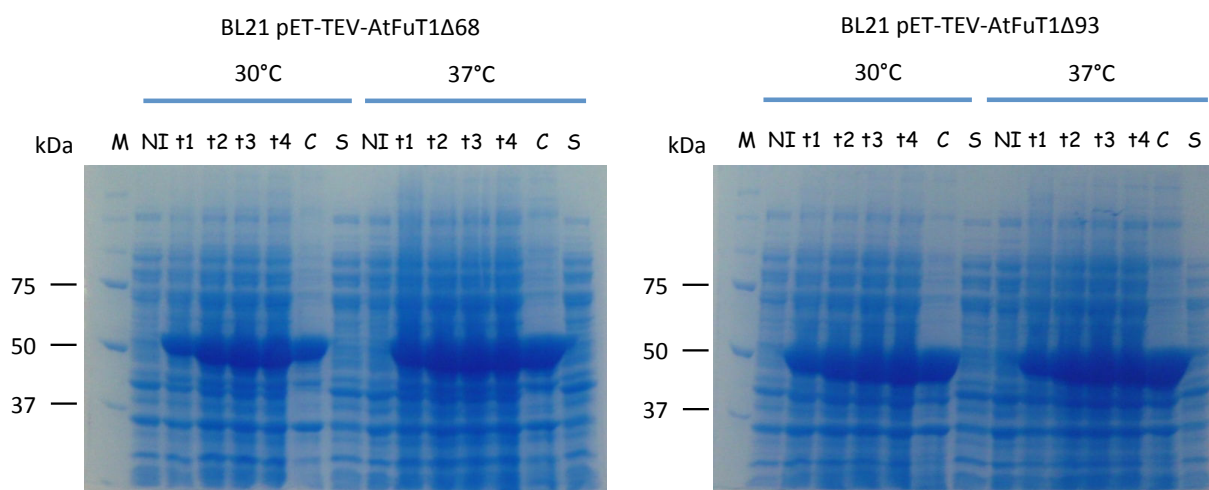


Figure II.5 : expression de AtFuT1<sub>Δ68</sub> et AtFuT1<sub>Δ93</sub> clonées dans le plasmide pET-TEV, avec la souche *E. coli* BL21.

Les temps t1 à t4 correspondent aux extraits totaux à 2h, 3h, 4h et 5h pour les essais à 30°C et 1h, 2h, 3h et 4h pour les essais à 37°C. Les bactéries prélevées sont alors centrifugées à 8 000 G et reprises en tampon de migration (SDS, DTT). Au dernier temps (t4) l'ensemble de la culture est récupéré. Les bactéries sont reprises en tampon HEPES 25 mM, NaCl 150 mM, pH 8, puis lysées mécaniquement (1,9 Kbar). Le lysat bactérien est alors centrifugé à 50 000xg pour séparer les phases « insoluble » et « soluble ». Chacun des échantillons a été déposé sur gel SDS-PAGE 12 %. NI = Non Induit : t0, avant l'ajout de l'inducteur IPTG. C = culot (fraction insoluble), S = surnageant (fraction soluble). Migration en gel SDS-PAGE, 10 % ou 12% d'acrylamide. M : marqueur de poids moléculaires.

Des bandes de forte intensité, légèrement supérieures à 50 kDa, apparaissent nettement dans les pistes correspondant aux quatre prélèvements suivant l'induction, et correspondent à la taille attendue d'AtFuT1. Pour les deux constructions et avec les deux températures utilisées, la protéine est présente dans la fraction insoluble et totalement absente dans la fraction soluble, ce qui semble indiquer une production de AtFuT1 en corps d'inclusion.

Les prédictions bioinformatiques suggèrent qu'AtFuT1 comporte plusieurs ponts disulfures qui peuvent être importants pour son repliement. L'absence de conditions oxydatives permettant la formation de ces ponts disulfures dans le cytosol de *E. coli* pourrait conduire à une agrégation de la protéine formant ces corps d'inclusion. Aussi, de nouveaux tests ont été réalisés dans des conditions favorisant la réalisation de ce type de liaisons au sein de la protéine, grâce à l'utilisation de souches bactériennes spécifiques. Les constructions d'AtFuT1 ont donc été insérées dans des bactéries Origami<sup>TM</sup>2 (DE3) et Tuner (Novagen).

- Les Origami<sup>TM</sup>2 comportent des mutations dans les gènes de la thioredoxine réductase (*trxB*) et de la glutathione réductase (*gor*), dont les fonctions sont de maintenir d'autres thioredoxines réduites dans le cytoplasme. L'absence de ces enzymes rend l'environnement de ce compartiment plus oxydant et favorise la réalisation de ponts disulfures. La température d'induction employée avec ces

bactéries a été baissée jusqu'à 15°C et la quantité d'IPTG divisée par 10 (de 1 mM à 0,1 mM) pour induire une synthèse plus lente de la protéine.

- La souche « *Tuner* », permet d'ajuster le niveau de production de protéines en fonction de la concentration d'IPTG. Induire un faible niveau d'expression peut aider à améliorer la solubilité et l'activité de certaines protéines. Quatre concentrations d'IPTG ont été employées : 10, 50, 100 et 1000 µM d'IPTG à une température d'induction de 18°C.

Trois tampons ont été utilisés pour lyser les cellules et tenter d'améliorer la solubilisation de la protéine (Tableau II.1). Le tampon 1 (en gras sur le tableau) est le tampon qui a été utilisé pour les tests d'activité de AtFuT1 produite en cellules d'insectes. Un pH de 8 et une force ionique élevée (NaCl 500 mM) ont été retenus en vue de la purification ultérieure sur colonne de Nickel. Le glycérol peut aider à stabiliser certaines protéines par sa viscosité, le Triton X-100 est un détergent qui favorise la solubilité des protéines peu solubles. Des acides aminés peuvent être employés (tampon 3) en petites quantités pour modifier les interactions ioniques (Golovanov, Hautbergue, Wilson, & Lian, 2004). Le NDSB (3-(1-Pyridino)-1-propane sulfonate) est un composé zwitterionique, fréquemment utilisé avec des protéines membranaires ou pour la renaturation des protéines.

Tableau II.1 : tampons utilisés pour la lyse des culots bactériens.

| tampon 1           | tampon 2        | tampon 3          |
|--------------------|-----------------|-------------------|
| <b>HEPES 25 mM</b> | HEPES 25mM      | Tris 25 mM        |
| <b>NaCl 500 mM</b> | NaCl 500 mM     | NaCl 500 mM       |
| <b>pH 8</b>        | Glycerol 5 %    | L-Glutamine 50 mM |
|                    | Triton X-100 1% | L-Arginine 50 mM  |
|                    | pH 8            | NDSB* 250 mM      |
|                    |                 | Glycérol 5 %      |
|                    |                 | pH 8              |

Aucune des conditions d'expression testées ni les différents tampons de lyse utilisés n'ont permis d'obtenir la protéine AtFuT1 dans les fractions solubles du lysat bactérien.

## II.2.2. Utilisation de protéines de fusion

Une nouvelle stratégie a donc été testée, consistant à fusionner AtFuT1 à une protéine bactérienne soluble, pour favoriser davantage la formation des ponts disulfure ou la solubilité de l'ensemble.

Les séquences AtFuT1 $\Delta$ 68 et AtFuT1 $\Delta$ 93 ont été introduites dans deux plasmides qui induisent chacun la synthèse d'une protéine de fusion à la séquence d'intérêt : les plasmides pET-32-TEV et le pBADM-41+.

- Le plasmide pET-32-TEV ajoute la thioredoxine A qui favorise la stabilité et le repliement de la protéine (Lavallie, 1993). Cette dernière se trouve à l'état oxydé dans les compartiments cellulaires où TrxB est absente et par conséquent aussi dans le cytoplasme des souches Origami. De plus, elle peut catalyser la formation de ponts disulfures même dans un environnement légèrement réducteur (Berkmen, 2012). Le plasmide pET-32 utilisé avec la souche OrigamiB est la combinaison la plus favorable pour la réalisation de ponts disulfures en bactérie. Cette dernière possède les mêmes propriétés que Origami2, mais les deux mutations des gènes *trx*B et *gor* sont maintenues par les antibiotiques kanamycine et tétracycline. Cette particularité permet d'effectuer la sélection des transformants à l'ampicilline, marqueur de résistance du pET32-TEV.
- Le plasmide pBADM-41+ ajoute la « *maltose binding protein* » (MBP) à la séquence d'intérêt. La MBP est l'une des protéines de fusion les plus utilisées pour améliorer la solubilité des constructions (Raran-Kurussi & Waugh, 2012). Dans le cas où la FUT1 serait glycosylée en cellule eucaryote et que cette glycosylation servirait à rendre la protéine soluble, la présence d'une protéine fusion telle que la MBP peut compenser l'absence de cette modification post-traductionnelle chez *E. coli*.

Les deux constructions dans le vecteur pET32-TEV ont été utilisées pour transformer les souches BL21 et Origami B. Les tests d'expression ont été réalisés à 18°C, durant la nuit, avec 0,5 mM d'IPTG. Les cellules ont été lysées en tampon 1 ([Tableau II.1](#)). Aucune des deux constructions produites TrxA-AtFuT $\Delta$ 68 et TrxA-AtFuT $\Delta$ 93 n'a été retrouvée dans la fraction soluble, que ce soit avec les bactéries BL21 ou OrigamiB ([Figure II.6](#)).

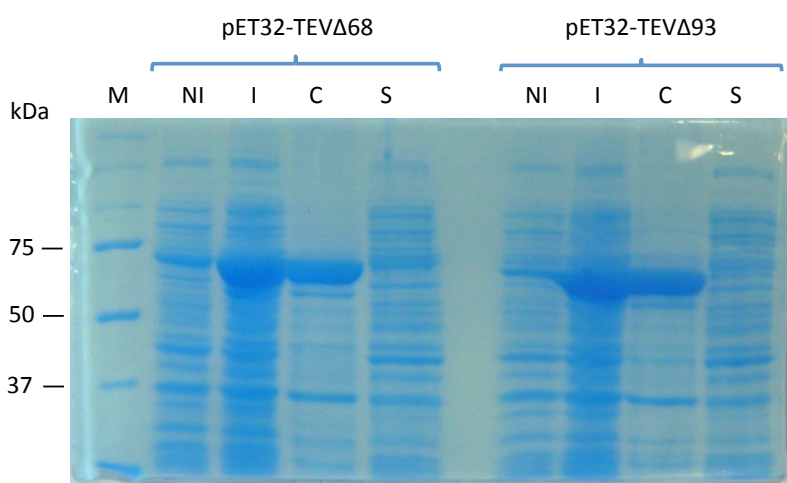


Figure II.6 : Expression des constructions pET32-TEV-AtFuT1<sub>Δ68</sub> et pET32-TEV-AtFuT1<sub>Δ93</sub> en bactéries OrigamiB.

Les tailles attendues des protéines de fusion sont respectivement de 73 kDa pour pET32-AtFuT1<sub>Δ68</sub> et 71 kDa pour pET32-AtFuT1<sub>Δ93</sub>. NI = extrait total non induit, I = extrait total induit, C = culot (fraction « insoluble ») S= surnageant (fraction soluble). Gel SDS-PAGE 10 % d'acrylamide. M : Marqueur de poids moléculaires.

Des tests d'expression similaires ont été réalisés avec le plasmide pBADM-41+ dont l'expression du promoteur pBAD est induite par la protéine AraC en présence d'arabinose. La figure II.8 montre les constructions produites dans les souches BL21 et OrigamiB. Les protéines correspondantes sont de taille attendue (proche de 100 kDa). La bande correspondant à la MBP seule migre autour de 40 kDa.

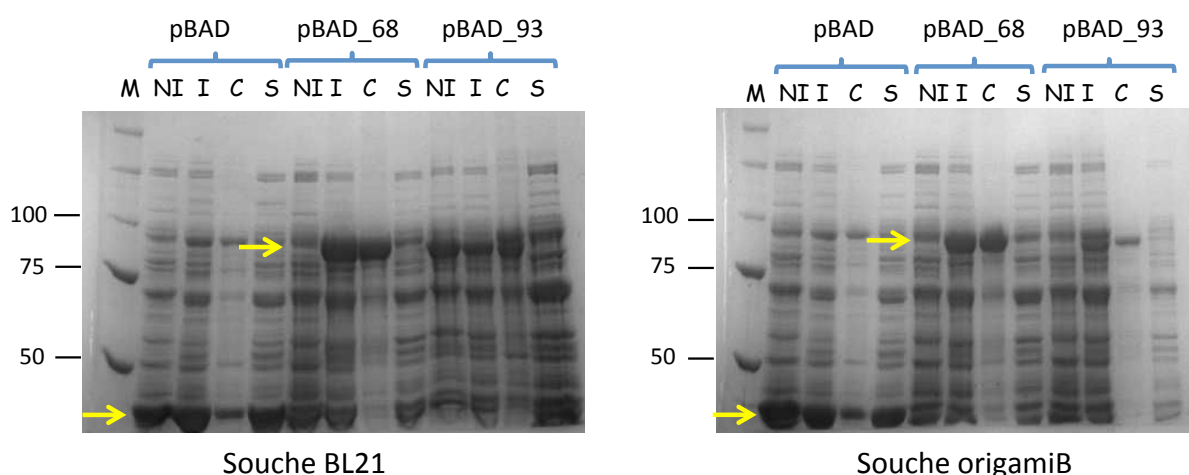


Figure II.7 : Expression des constructions pBADM41-AtFuT1<sub>Δ68</sub> et pBADM41-AtFuT1<sub>Δ93</sub> en cellules BL21 et OrigamiB.

Dans chaque cas, un contrôle avec le plasmide pBADM41 sans insert est effectué. Migration en gel SDS-PAGE 8 % d'acrylamide. NI = extrait total non induit, I = extrait total induit, C= culot (fraction « insoluble ») S= surnageant (fraction soluble). Gel SDS-PAGE 10 % d'acrylamide. M : Marqueur de poids moléculaires.

Seule la MBP est observable dans la fraction soluble après lyse des cellules. Les constructions AtFuT1 en fusion avec la MBP se retrouvent dans la fraction insoluble uniquement.

Une dernière tentative d'expression dans le périplasme a été effectuée. Ce compartiment présente l'avantage d'être un environnement naturellement favorable à la réalisation de ponts disulfures chez *E. coli*. Il est oxydant et comporte les systèmes enzymatiques appropriés (Messens & Collet, 2006). Les tests d'expression ont été effectués avec le plasmide pMALp2TEV, dérivé du plasmide pMALp2X. Ce dernier contient le gène *malE* qui code pour une sous-unité de transporteur du maltose MBP, avec son peptide signal l'adressant dans le périplasme. Les protéines de fusion attendues font environ 100 kDa, comme avec pBADM-41+. Dans ces derniers tests nous nous sommes heurtés à un problème de toxicité des produits et seule la présence de la MBP a pu être détectée par SDS-PAGE (résultat non montré).

## II.2.3. Bilan des tests d'expression

Aucune combinaison de plasmides et souches bactérienne utilisées n'a donc permis d'obtenir AtFuT1 soluble. L'ensemble des conditions utilisées pour ces tests d'expressions est résumé dans le [tableau II.2](#).

**Tableau II.2 : combinaisons de souches et de vecteurs utilisées pour les tests de production et de solubilisation d'AtFuT1<sub>Δ68</sub> et AtFuT1<sub>Δ93</sub> en *Escherichia coli*.**

| Souche E. coli | Vecteur     | Proteine fusion | Compartiment de production | Températures d'induction | Concentrations d'IPTG ou d'arabinose                            |
|----------------|-------------|-----------------|----------------------------|--------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| BL-21          | pET-TEV     | non             | cytoplasme                 | 18-30-37°C               | 1 mM                                                            |
| Origami2       | pET-TEV     | non             | cytoplasme                 | 15 °C                    | 1 mM; 0,1 mM                                                    |
| Tuner          | pET-TEV     | non             | cytoplasme                 | 18°C                     | 10 <sup>-2</sup> , 5.10 <sup>-2</sup> , 10 <sup>-1</sup> , 1 mM |
| BL-21          | pET32-TEV   | TrxA            | cytoplasme                 | 18°C                     | 0,2 mM                                                          |
| OrigamiB       | pET32-TEV   | TrxA            | cytoplasme                 | 18°C                     | 0,2 mM                                                          |
| OrigamiB       | pBADM-41(+) | MBP             | cytoplasme                 | 18°C                     | 0,2 %                                                           |
| BL21           | pBADM-41(+) | MBP             | cytoplasme                 | 18°C                     | 0,2 %                                                           |
| K12            | pMALp2TEV   | MBP             | périplasme                 | 18°C                     | 0,2 ; 0,4 mM                                                    |

**En conclusion :** Huit combinaisons différentes de souches et plasmides ont été utilisées, avec deux formes tronquées d'AtFuT1 ([Tableau II.2](#)). Les protéines ont toujours été produites en quantités importantes dans le cytoplasme, mais n'ont jamais été observées dans les fractions solubles. Les essais d'adressages dans le périplasme n'ont pas permis de visualiser les constructions et ont inhibé la croissance des bactéries.

Un test d'activité a été réalisé sur la majorité des fractions solubles, pour rechercher une activité fucosyltransférase, dans le cas où une faible proportion de l'enzyme soit soluble ([Figure II.8](#)). Les contrôles utilisés sont le tampon 1, de reprise des culots de bactéries ([Tableau II.1](#)) et un surnageant de milieu de culture de cellules d'insectes infectées par le virus recombinant BaculoGold, contenant la construction AtFuT1<sub>Δ68</sub>.

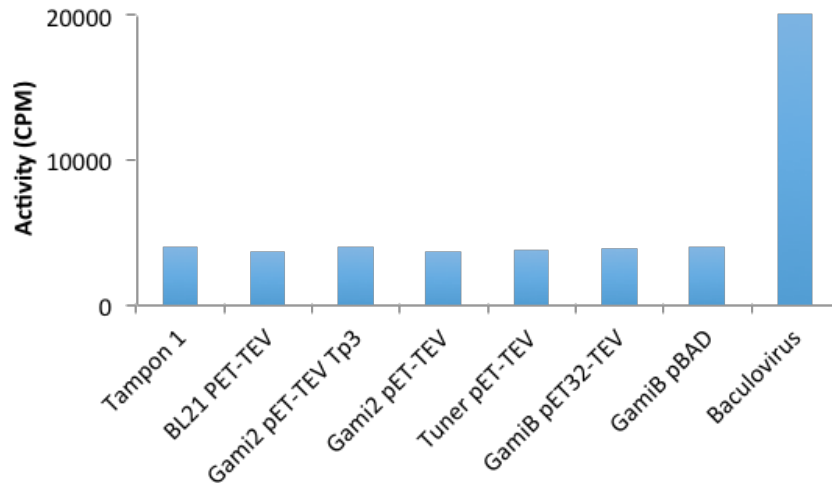


Figure II.8 : recherche d'activité fucosyltransférase sur les fractions solubles des productions d'AtFuT1 $\Delta_{68}$  en bactéries.

Le test utilisé est le même que celui décrit dans la figure 2.5b. Le tampon 1 est utilisé en contrôle négatif, et AtFuT1 $\Delta_{68}$  produite en cellules d'insectes en contrôle positif (baculovirus).

Aucune des fractions solubles n'a montré la moindre activité de transfert de fucose, contrairement à la protéine AtFuT1 $\Delta_{68}$  produite en cellules d'insecte (contrôle positif). Par conséquent, les essais de production en bactérie ont été arrêtés. Les efforts se sont portés ensuite sur la production et la purification de l'enzyme à partir de cellules d'insectes.

### II.3. Production d'AtFuT1 en cellules d'insectes

Le système de cellules d'insecte cultivées en adhérence et infectées par le virus BaculoGold (BD Biosciences) a été mis en place au laboratoire en 2001. Il a toujours été utilisé pour produire de petits volumes de milieu (10-20 ml), dont les protéines sécrétées dans le surnageant sont relativement diluées mais en quantité suffisantes pour caractériser des activités enzymatiques à l'aide de test sensibles (radioactivité). Cette méthode répondait au besoin de produire une GT eucaryote avec une probabilité élevée qu'elle soit active, et la faible quantité d'enzyme s'avère généralement suffisante pour ces expériences de biochimie. En revanche, ce système n'est plus adapté dès lors que l'on veut obtenir des quantités de protéines de l'ordre de plusieurs milligrammes pour des tests de cristallisation. **La recherche d'un moyen d'obtenir suffisamment d'enzyme pour les études cristallographiques a donc représenté un enjeu important de ce projet. La construction utilisée pour cela est AtFuT1 $\Delta_{68}$ , dont les premiers tests avaient montré que l'enzyme est active dans ce système d'expression (cf partie II.1)**

## II.3.1. Production en cellules adhérentes

La culture de cellules en adhérence est la technique en place au début du projet. Deux lignées cellulaires comportant chacune leurs spécificités sont cultivées au laboratoire :

- les Sf9 (Invitrogen), issues de la chenille du papillon *Spodoptera frugiperda*, un ravageur des cultures de maïs et de coton d'Amérique du Nord.
- les High-five (Hi5 ; Invitrogen), ou « BTI-TN-5B1-4 », issues de la chenille de *Trichoplusia ni*, appelée aussi *la fausse-arpenreuse du chou*.

Les cellules Sf9 sont classiquement utilisées pour l'étape initiale d'infection et pour générer des stocks de virus et les cellules Hi5 pour produire la protéine d'intérêt. Trois milieux commerciaux optimisés pour la croissance de ces cellules sont utilisés :

- Grace (Invitrogen) complété par 10 % de sérum de veau fœtal (Sigma)
- Express-five SFM (Invitrogen) complémenté par 16 mM de glutamine (Gibco)
- Ex-cell 405 (Sigma)

Ces trois milieux sont complémentés par ajout de gentamycine à une concentration de 50 µg/ml et sont employés avec deux types de boîtes :

- Nunc BioLite (ThermoScientifique)
- Cell Bind Corning (Sigma)

Les cellules Sf9 sont cultivées uniquement dans le milieu Grace, alors que les High-five le sont en milieu Express-five et Ex-cell 405. Les boîtes Nunc dites « normales » sont utilisées pour les Sf9 et pour les High-five en Express-five, alors que les cellules High-five en milieu Ex-cell 405 nécessitent les boîtes Cell Bind (Figure II.9). Ces dernières permettent une meilleure adhésion des cellules, mais sont 3 à 4 fois plus chères que les

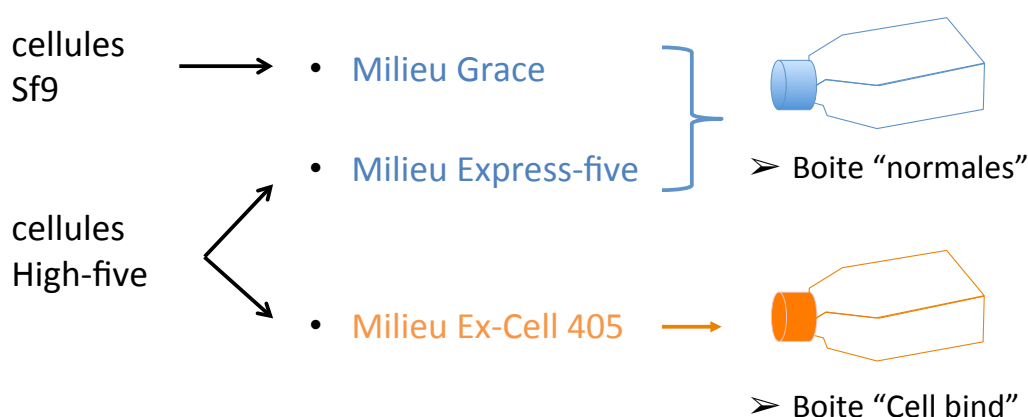


Figure II.9 : illustration des souches de cellules d'insectes, milieux et flasques utilisés au laboratoire.

Nunc (100 boîtes de 75 cm<sup>2</sup> coutent respectivement 76 et 280 €).

Les cellules sont cultivées dans une étuve à 27°C. Quand elles arrivent à confluence, elles sont diluées approximativement par 5 pour les Sf9 et par 8 pour les cellules High-five, tous les 3 et 4 jours.

L'étape de co-transfection des cellules Sf9 par le plasmide recombinant et le baculovirus linéarisé BaculoGold™, et l'obtention d'un stock de virus recombinant de titre élevé (environ  $10^8$  /ml) sont décrits dans la partie Matériels et Méthodes. Pour une production de protéines recombinantes, les cellules High-five sont infectées avec une MOI (*multiplicity of infection*) de 1 à 5, soit 1 à 5 particules virales par cellule. Les cellules sont ensuite incubées à 27°C pendant 3 à 5 jours. La production de la protéine dans le surnageant est suivie par SDS-PAGE et western-blot comme décrit dans la partie Matériels et Méthodes, ce qui permet ainsi d'optimiser la durée de l'infection.

La méthode de production en boîte, utilisée dans un premier temps, a permis de faire de nombreuses mises au point, tant au niveau des procédures de productions que de purifications, mais toujours sur de petits volumes (5 à 50 ml). Toutefois des limitations sont vite apparues lors d'essais visant à produire les protéines recombinantes en quantité nécessaire et suffisante aux tests cristallographiques. En effet, de manière à cribler suffisamment de conditions cristallographiques avec un même lot de protéine, il est raisonnable de disposer au minimum de 1 mg de protéine pure. Les premières purifications ont permis d'estimer à au moins un litre le volume nécessaire pour atteindre cet objectif. Etant donné le coût des boîtes « Cell bind », le choix s'est porté sur le milieu Express-five qui s'utilise avec les flasques « Nunc ». Quatre volumes de boîtes sont disponibles : 5 ml (dans lesquelles sont toujours maintenues les cellules, 12, 28 et 80 ml). Pour obtenir 1 litre de milieu, l'amplification des cellules prend 2-3 semaines, auxquelles s'ajoutent les quatre jours d'infections (figure II.10). Une production d'un litre avec ce matériel revient à environ 200 € de boîtes et 100 € de milieu (1L). Pour l'ensemble de ces raisons, ainsi que pour des problèmes de stockage et de taille des étuves, on ne peut pas envisager plus de une production par mois.

A

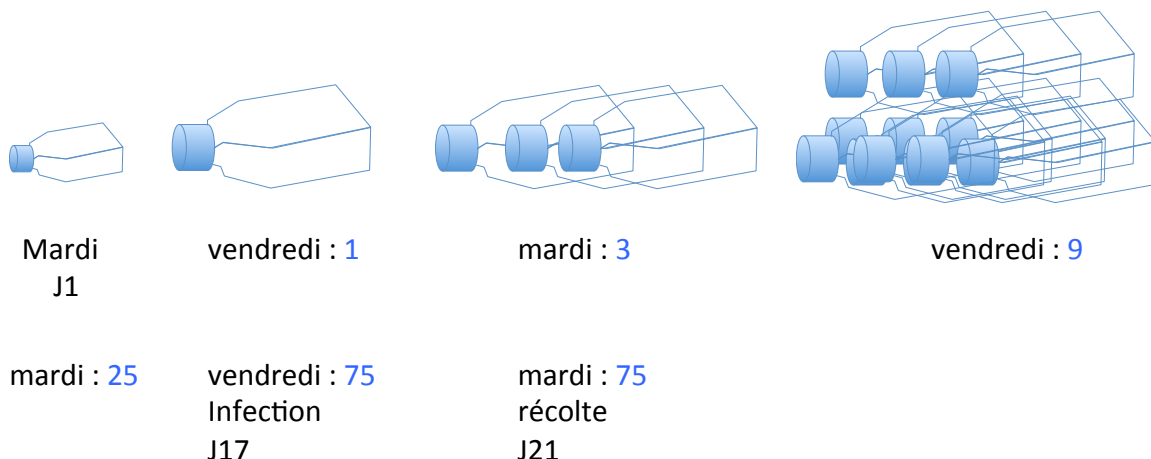


Figure II.10 : Une production de 900 ml de milieu Express-five avec des cultivées en adhérence.

Cellules High-five, boîtes « Nunc » de 12 ml. A) Représentation des étapes d'amplification et d'infection des cellules, et le nombre de boîtes nécessaires (75) pour la capacité de l'étuve. B) Au jour de l'infection (J17), 75 boîtes sont mises en culture et infectées par le virus. C) Au moment de la récolte (J21) le milieu est récupéré des boîtes, à la pipette pour limiter les pertes. Il est alors placé dans des godets pour être centrifugé afin de récupérer le surnageant. D) Le volume de déchets produits correspond à environ cinq sacs à autoclave.

Des boîtes de taille plus importante que celles représentées sur la [figure II.10](#) ont été utilisées, mais les productions en boîte n'ont jamais pu dépasser 1 litre de milieu. La quantité de AtFuT1 obtenue pour la cristallisation dans ces conditions varie entre 0,1 et 0,3 mg (voir chapitre purification), soit bien en dessous de l'objectif fixé. La culture en boîte a toutefois permis d'effectuer plusieurs purifications d'AtFuT1 sur des volumes conséquents en milieu Express-five et Ex-Cell 405. Ces expériences ont permis de montrer que 3,5 fois plus de protéines sont obtenues après purification avec le milieu Ex-Cell 405 qu'avec le milieu Express-Five. Les productions en boîtes ont aussi permis d'effectuer les premiers tests de cristallisation et d'identifier des conditions prometteuses. Ces résultats ont donc motivé la poursuite du projet, ainsi que les efforts de modification de la méthode de culture afin d'accroître les fréquences de productions, et la quantité de protéine obtenue pour chaque production.

## II.3.2. Mise en place d'une méthode de culture en suspension

De manière à produire de plus gros volumes de milieux et plus fréquemment, la seule possibilité envisagée a été de cultiver les cellules en suspension. Cette méthode de culture a été reproduite à partir des protocoles de la plateforme d'un laboratoire partenaire, puis adaptée aux matériels et aux disponibilités en main d'œuvre de notre unité.

### ➤ Mise en place

Ceci a été effectué avec le soutien technique de la plateforme de production de protéines en cellules d'insecte de l'UVHCI « *Unit of Virus Host Cell Interactions* » (UMI 3265 UJF-EMBL-CNRS). Ce laboratoire cultive différentes lignées cellulaires dans différents milieux, dont les High-five en Express-five. Les cellules sont cultivées sous agitation (100-110 tpm) dans des Erlenmeyer en verre de 200 ml à 2 litres, remplis au cinquième de leur volume par du milieu. La population est maintenue à 26°C en phase exponentielle de croissance, entre 0,5 et 1 million de cellules par millilitre. Pour cela, elles sont diluées par deux tous les deux jours. L'infection est réalisée à  $0,5 \times 10^6$  cellules/ml.

Dans un premier temps, les protocoles de l'UVHCI ont été appliqués. Par la suite, des mises au point ont été effectuées concernant la vitesse de rotation, la température de culture pour les cellules en maintien, la fréquence des passages et la concentration cellulaire au moment de l'infection.

### ➤ Culture en milieu Ex-Cell 405

Les cellules High-five en milieu Express-five ont été adaptées rapidement à la culture en suspension: en une semaine, le taux de mortalité a été inférieur à 5 % et aucun agrégat n'était visible. L'adaptation de ces cellules avec le milieu Ex-Cell 405 a été plus difficile. Une attention particulière a été dédiée à la mise au point de la culture dans ce milieu, puisque ce dernier présente un rendement de production d'AtFuT1 3 fois supérieure que le milieu Express-five en boîte (chapitre purification). Dans un premier temps des agrégats de cellules sont apparus systématiquement en une semaine de culture et le taux de mortalité atteignait 20 %. Ce milieu semble plus visqueux que l'express-five et la taille des cellules est environ 50 % plus importante. Il a alors été supposé que la vitesse d'agitation devait être optimisée. La vitesse du plateau a été augmentée par seuil de 5 tpm à chaque passage en observant le comportement des cellules, jusqu'à 130 tpm. Ceci a permis d'obtenir une population de cellules uniquement individuelles, multipliée en moyenne par trois tous les deux jours à 26°C, et un taux de mortalité moyen inférieur à 2 %.

Ces trois paramètres (présence ou non d'agrégats, taux de croissance et de mortalité) sont contrôlés à chaque repiquage des cellules. Les cellules sont diluées à environ  $0,4 \times 10^6$  cellules/ml et récupérées à environ  $1,5 \times 10^6$  cellules/ml ([tableau II.3](#)).

**Tableau II.3 : cycles de passage des cellules cultivées en suspension.**

Les concentrations données correspondent à la dilution et à la récupération suivante. Les concentrations limites, à ne pas dépasser régulièrement sont :  $0,3$  et  $2 \times 10^6$  cellules / ml (recommandation UVHCI). Une température baissée à  $18^\circ\text{C}$  ralentit la division cellulaire.

| Température de culture | Concentrations (million cellules / ml) | Fréquence de passage |
|------------------------|----------------------------------------|----------------------|
| $26^\circ\text{C}$     | $0,4 \rightarrow 1,5$                  | 2-3 jours            |
| $18^\circ\text{C}$     | $0,4 \rightarrow 1,5$                  | 3-4 jours            |

Le taux de croissance est l'indicateur le plus sensible de l'état de la population : on vérifie notamment que les cellules sont en capacité de se multiplier par 3 ou 4 entre chaque repiquage dans les conditions mentionnées. Sinon il est préférable de recommencer avec un nouveau stock. Baisser la température de l'Erlen à  $18^\circ\text{C}$  pour le maintien des cellules permet de plus facilement respecter les concentrations limites ([Tableau II.3](#)), notamment pendant les WE et jours fériés. Cela économise aussi du milieu de culture.

### ➤ **Augmentation du volume de culture et infection**

Préalablement à une infection, le volume de milieu et la quantité de cellules sont généralement augmentés jusqu'à atteindre 1 – 1,4 litre, avec 1 – 2 milliard de cellules environ. Le repiquage se fait dans un Erlen d'une taille adaptée au facteur de dilution (quatre à cinq fois le volume final). Les cellules destinées à être infectées sont transférées dans un incubateur / agitateur dont la température est amenée de  $20^\circ\text{C}$  à  $27^\circ\text{C}$  en quelques jours. Au moment où se fait l'infection, les cellules doivent avoir été diluées par deux au minimum, de manière à disposer de suffisamment de nutriment et d'oxygène pendant la durée de l'infection (Drugmand, 2007 ; Beltrametti, Bögli, Greller, Eibl, & Eibl, 2011 ; Rausch, Pörtner, & Knäblein, 2013). La concentration optimale observée pour obtenir le plus de protéine est de  $0,7 - 2 \times 10^6$  cellules par millilitre (Mc/ml) au moment de l'infection. Cela implique, pour respecter un facteur de dilution de 2 minimums, que les cellules soient à  $1,4 - 4 \text{ M/ml}$  juste avant la dernière dilution. Cette concentration, un peu plus élevée que pour le maintien ([Tableau II.3](#)) est augmentée graduellement pendant les derniers passages. Typiquement : 0,6 L de milieu avec 3 Mc/ml est dilué par 2 (1,2 L final) dans un erlenmeyer de 6 L, puis infecté par environ 54 ml de surnageant infectieux à  $10^8$  pfu/ml (MOI de 3) pendant 4 jours.

Les écarts de taille entre récipients nécessitent d'adapter les vitesses de rotation : ce paramètre modifie de manière importante la vitesse linéaire de l'ondulation au bord de la paroi, et la turbulence globale dans le récipient. Les cellules sont sensibles aux forces de cisaillements. Par conséquent, elles meurent si elles sont maintenues par exemple à une rotation de 130 tpm dans un Erlen de 5 L. La vitesse du plateau est donc baissée au fur et à mesure que la taille de l'Erlen augmente ([tableau II.4](#)). Cette méthode de culture des cellules en suspension permet de passer en 15 jours d'un stock de 1 ml cellules congelées dans l'azote liquide à 1,5 litre de culture cellulaire prête à être infectée.

**Tableau II.4 : Vitesse de rotation du plateau utilisée en fonction de la taille de l'Erlen.**

Ces valeurs sont données pour un remplissage de 20 % du volume total. Elles représentent une tendance : les cellules supportent environ 10 % de variation.

| Volume Erlen (L)        | 0,1 | 0,25 | 1   | 2   | 5  | 6  |
|-------------------------|-----|------|-----|-----|----|----|
| Vitesse angulaire (tpm) | 130 | 120  | 110 | 100 | 90 | 85 |

Les conditions de cultures ont été mises au point avec le milieu Ex-Cell 405, dont les rendements en FUT1 sont trois fois meilleurs que pour Express-five. Le problème lié au coût prohibitif des boîtes de cultures est alors résolu. Le milieu Ex-Cell 405 utilisé pour ces grosses productions est commandé en poudre, réhydraté, complété et filtré au laboratoire. Cela permet de diminuer le prix de 65 à 40 € / L.

Avec la méthode de culture en suspension, plusieurs amplifications de cellules peuvent être effectuées en parallèle, de manière à effectuer une infection par semaine. Beaucoup de temps est également gagné en éliminant la manipulation de dizaines de boîtes. De plus, le lot de protéines AtFuT1 récolté est probablement plus homogène, puisque les cellules sont toutes infectées au même moment, dans un même récipient. En procédant de cette manière, en moyenne 1 à 1,5 L peuvent être produit aisément, permettant d'obtenir 1 à 2 mg de protéines pour la cristallisation. Cette méthode de production de la protéine répond au besoin du projet en termes de quantité et de qualité de protéines nécessaires.

## ➤ Culture des cellules en bio-réacteur

Deux essais de culture des cellules et de production d'AtFuT1 ont été effectués dans un bioréacteur disponible au CERMAV ([Figure II.11](#)). Ce dernier est équipé d'une cuve de 2 L et de deux pales du type Rushton (Applikon, Chemglass life sciences). Les pales de types de type Rushton sont habituellement réservées à la culture de bactéries, tandis que celles de type « marine » conviennent davantage aux cellules eucaryotes. Un aérateur en métal fritté avec des pores de 15 µm est placé sur le bas de la cuve, pour oxygéner le milieu et contribuer à garder les cellules en suspension. Les cellules (High-

five, milieu Ex-Cell 405) ont été cultivées jusqu'à un volume de 500 ml en erlen puis transférées en condition stérile dans la cuve du bioréacteur. La vitesse des pales et le débit d'air ont été réglés de manière à retrouver une agitation proche des conditions de production en Erlen. Le bulleur a été réglé au maximum de ce qui peut l'être, en prenant soin de ne pas créer de mousse à la surface du milieu, et les pales à 100 tpm.

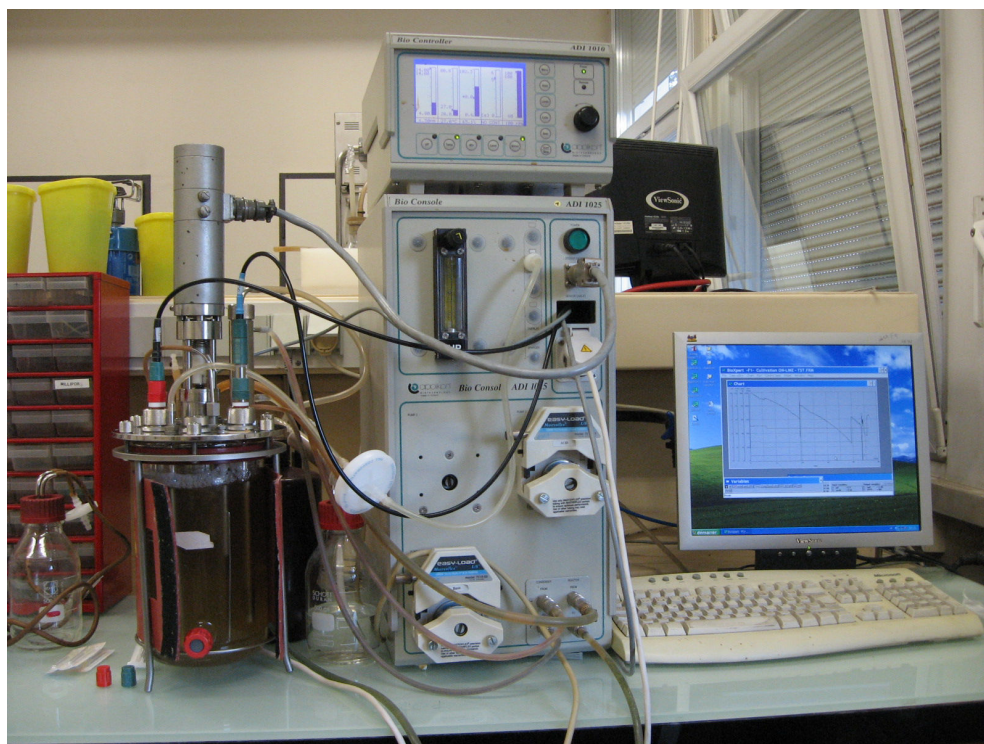


Figure II.11 : Culture des cellules d'insectes High-five en milieu Ex-Cell 405 dans un bioréacteur.

Le milieu contenant les cellules (100-500 ml) doit être versé dans la cuve sous hotte. Ensuite, le reste du milieu peut être ajouté pendant le fonctionnement de l'appareil. Une fois l'agitation fixée à 100 tpm, le débit d'air dissous est le principal paramètre à contrôler. Les prélèvements de cellules s'effectuent par une seringue piquée dans le caoutchouc gris au bas de la cuve.

Les cellules ont poussé dès le premier essai à la même vitesse qu'en Erlen. Elles ont pu être infectées, récoltées, et AtFuT1 purifiée du surnageant comme lorsque produite en Erlen. Cette méthode de culture ne permet pas d'augmenter la densité cellulaire. Par contre, le milieu est ajouté plus facilement dans la cuve, les prélèvements pour le suivi de la viabilité n'impliquent pas de transporter ni d'ouvrir le récipient, et les paramètres de culture - pH et oxygénation - sont maîtrisés et enregistrés. De plus, l'Erlen le plus volumineux (6L) ne peut contenir que 1,5 L de milieu maximum alors que les cuves du bioréacteur utilisées existent en 3, 5 et 7 litres.

### II.3.3. Comparaison des systèmes des cultures employés

Le tableau 2.5 résume les principaux critères de comparaison entre les différents systèmes de culture pour la production d'AtFuT1. La comparaison se base sur la production d'un litre de milieu Ex-Cell 405. Le cout de la production avec le milieu

Express-five en boîtes « Nunc » n'est pas mentionné, mais il est similaire à celui avec Excell 405 en boîtes « Cell bind », puisqu'il faut trois fois plus de matériel pour la même quantité de protéine. Cette comparaison est faite au prix par mg de protéine « utile » pour la cristallisation, c'est à dire après toutes les étapes de purifications et de concentrations. Cependant, jamais cette quantité de protéine n'a été obtenue en une production par la culture en adhésion. Pour chaque système, le volume maximum productible est donné dans les conditions de l'équipe et de ce doctorat : cela tient compte des moyens financiers et de la logistique. Pour la culture en adhérence les limitations proviennent du coût, de la capacité de stockage des boîtes, et de la taille de l'étuve. Pour la culture en Erlen ou en bioréacteur, un seul incubateur et une seule cuve sont utilisés à la fois.

**Tableau II.5 : comparatif des différentes méthodes de cultures employées.**

Sont mentionnés les principaux éléments pris en comptes dans le choix de la méthode de culture des cellules d'insectes High-five pour la production d'AtFuT1<sub>Δ68</sub>.

| Méthode de culture                         | Boîtes   | Erlenmeyer  | bioréacteur |
|--------------------------------------------|----------|-------------|-------------|
| Coût (€/mg) – milieu + boîtes              | 500      | 40          | 40          |
| fréquence de production                    | 1 / mois | 1 / semaine | 1 / semaine |
| temps nécessaire pour passage et infection | 3 h      | 30 mn       | 10 mn       |
| Volume max productible                     | 1 L      | 1,5 L       | 4 L         |

Initier la culture en bio-réacteur implique une opération délicate de transvasement des cellules à partir d'un Erlen, mais ensuite l'ajout du milieu et le prélèvement des cellules sont facilités par l'appareillage. Le suivi de la consommation d'oxygène peut aussi être une donnée utile pour comparer des productions entre elles.

---

## **Chapitre III : Purification d'AtFuT1**

---



## III. Purification d'AtFuT1

Cette partie du doctorat a été consacrée à la mise en place d'un protocole de purification efficace d'AtFuT1 à partir de surnageant de culture de cellules d'insectes. Les besoins en quantité de protéine pour le criblage de conditions de cristallisations sont de l'ordre du milligramme par lot, d'une enzyme pure à au moins 90 % et active. La protéine AtFuT1 est produite tronquée, avec un tag (His)<sub>6</sub> en position N-terminale. La première étape de purification envisagée est une chromatographie de type IMAC (*Immobilized Metal Affinity Chromatography*) sur une colonne de nickel commerciale (ex : His-Trap FF de GE Healthcare). *Puisque seule la construction His-AtFuT1<sub>Δ68</sub> n'est conservée pour les purifications à partir de cellules d'insectes, le terme AtFuT1 employé dans ce manuscrit fera référence à cette dernière, sauf précision indiquée.*

### III.1. Tests préliminaires

Des tests préliminaires menés au laboratoire ont permis d'établir que la protéine AtFuT1 produite dans le milieu de culture des cellules d'insectes n'était pas ou très faiblement retenue sur colonne His-trap FF lorsque des volumes de milieu supérieurs à 10 ml étaient utilisés. L'hypothèse retenue pour expliquer cette observation serait que l'un des composés du milieu de culture provoque le décrochement du nickel de la colonne, la rendant inopérante (la composition précise du milieu n'est pas fournie par le distributeur). Le nickel serait ainsi « lessivé » par le passage du milieu. Afin de contourner cette difficulté, nous avons opté pour une étape de dialyse avant dépôt sur la colonne de nickel afin de vérifier l'effet de ce traitement sur le rendement de purification d'AtFuT1. Cette étape de dialyse (MWCO 14kDa) réalisée avec le tampon d'équilibration ([tableau III.1](#)) s'est révélée très vite fastidieuse vu les volumes de milieux à traiter. Nous avons alors testé en parallèle la lyophilisation préalable du surnageant avant dialyse. Cette étape avait pour objectif de concentrer le volume d'échantillon à dialyser. **Lors de ces premiers tests, les cellules d'insectes (High-five) produisant AtFuT1 étaient cultivées en adhérence (boîtes « Cell-bind ») dans du milieu Ex-Cell 405 : c'est celui qui était alors disponible au laboratoire.**

Une fois le milieu de culture collecté, il est clarifié par centrifugation et directement traité, ou bien conservé à -80°C puis décongelé par la suite pour être dialysé. Après dialyse, la purification est réalisée sur un appareil Akta prime avec une colonne His-Trap FF (1 ml) préalablement équilibrée avec du tampon d'équilibration. L'échantillon est injecté par fractions de 40 ml, et les conditions de tampons utilisées sont résumées dans le [tableau III.1](#).

**Tableau III.1 : conditions employées pour purifier AtFuT1 sur colonne His-Trap FF**

|                 |                                                                   |
|-----------------|-------------------------------------------------------------------|
| Colonne :       | <b>His-Trap FF (GE Healthcare)</b>                                |
| Équilibration : | NaCl 500 mM, Hepes 25 mM, pH 8, imidazole 20 mM                   |
| Lavage :        | NaCl 500 mM, Hepes 25 mM, pH 8, imidazole 60 mM                   |
| Élution :       | tampon de lavage ; gradient 60 → 500 mM imidazole en 10 mn        |
| Débit :         | 0,8 ml/mn                                                         |
| Température :   | 25 °C                                                             |
| Appareil :      | Akta prime / Injection avec pompe péristaltique pour vol > 120 ml |

Les analyses des fractions issues des étapes de lavage et d'élution ont révélés que les rendements obtenus sont très faibles, comme le montrent les valeurs rassemblées dans le [tableau III.2](#).

**Tableau III.2 : comparaison des rendements des différentes purifications réalisées sur colonne His-Trap FF**

+ indique que l'échantillon a été totalement lyophilisé pour être repris ensuite en eau distillée. +/- indique que la lyophilisation a été employée pour réduire le volume de l'échantillon à dialyser.

| Purification n° = | Volume échantillon (ml) | Lyophilisation | Masse de protéine purifiée (mg) | Rendement (mg / 100 ml) |
|-------------------|-------------------------|----------------|---------------------------------|-------------------------|
| 1                 | 40                      | -              | 0,15                            | 0,38                    |
| 2                 | 120                     | +              | 0,28                            | 0,23                    |
| 3                 | 120                     | -              | 0,25                            | 0,21                    |
| 4                 | 235                     | +              | 0,3                             | 0,13                    |
| 5                 | 740                     | +/-            | 0                               | 0                       |

Pour la purification n°= 5, le surnageant de milieu de culture a été concentré de 740 ml à 200 ml par 20 h de lyophilisation. Deux dialyses successives ont ensuite été effectuées. L'échantillon a alors été passé à travers la colonne de nickel HisTrap FF 1 ml, classiquement utilisée au laboratoire. En sortie, la fraction non retenue a été collectée en quatre tubes de 40 mL chacun. Les lavages et élution ont été effectués comme décrit dans le [tableau III.1](#). L'analyse par SDS-PAGE ([figure III.1](#)) regroupe l'ensemble des fractions de chaque étape : échantillon concentré avant injection, fraction non retenue (FNR), lavage et élution.

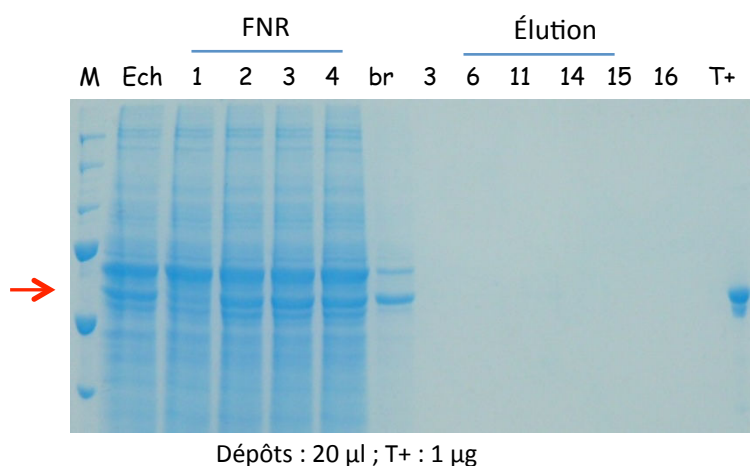


Figure III.1 : Tentative de purification d'AtFuT1 sur HisTrap FF (GE) à partir de 740 ml de milieu Ex-Cell 405

Cellules cultivées en adhérence. Le surnageant de milieu de culture a été concentré à 200 ml par lyophilisation et dialysé. Ech = échantillon : surnageant de milieu de culture Ex-Cell 405, concentré environ 4X et dialysé. 1-> 4 fraction non retenue, fractions de 40 ml, (br = branchement de la colonne sur l'Akta), 3 = lavage, 6-> 16 : éluion. T+ = 1 µ d'AtFuT1 précédemment purifiée. Gel SDS-PAGE 10 % d'acrylamide, coloration des protéines au bleu de coomassie.

Aucune protéine n'est visible dans les fractions correspondant au lavage et à l'éluion. De façon intéressante une bande protéique (flèche rouge, fig. III.1), à la taille attendue pour AtFuT1, est présente dans l'échantillon et absente de la FNR1. Elle réapparaît ensuite dans les FNR 2 à 4. La protéine semble se fixer sur la colonne dans un premier temps mais se décroche par la suite, probablement à cause d'un lessivage du nickel. Cela concorde avec les résultats des purifications précédentes : plus le volume de milieu à purifier est important, moins de protéine AtFuT1 est récupéré.

En conclusion de ces tests, on remarque que l'étape de lyophilisation n'impacte pas la quantité de protéine purifiée (tableau III.2 purification 2 et 3). Les mesures d'activité effectuées sur les échantillons correspondants n'ont pas mis en évidence d'effet négatif de cette étape. D'un point de vu pratique, la lyophilisation est longue à réaliser dans les conditions du laboratoire. Elle peut être employée simplement pour concentrer l'échantillon préalablement à la dialyse, mais le volume atteint ne peut pas être contrôlé sans décongeler l'échantillon. **Surtout, dans les conditions de ces expériences, plus le volume initial de milieu à dialyser est important, plus le rendement en protéine AtFuT1 diminue.** Ces deux étapes de préparation de l'échantillon sont donc difficilement adaptables à des volumes élevés : elles induisent un temps de préparation important, une variabilité entre les lots, et un risque pour l'échantillon lors de sa manipulation. Surtout, l'effet probable de lessivage des ions Nickel par le milieu de culture n'est pas résolu avec l'étape de dialyse.

## III.2. Purification sur colonne IMAC adaptée au milieu de culture eucaryote

Nous avons alors pris connaissance de deux nouvelles résines nouvellement mises sur le marché et spécifiquement conçues pour la purification de protéines recombinantes produites en milieu de cellules eucaryotes. Il s'agit des résines de nickel « HisTrap™ excel » (GE Healthcare) et « cOmplete™ His-Tag » (Roche). Celles-ci sont prévues pour supporter le passage de un à plusieurs litres de milieu. Les premiers essais ont été effectués avec la résine HisTrap™ excel en colonnes de 1 ml. La **figure III.2** est le résultat d'une purification d'AtFuT1 sur résine HisTrap™ excel avec le même échantillon que présenté en **figure III.1**.

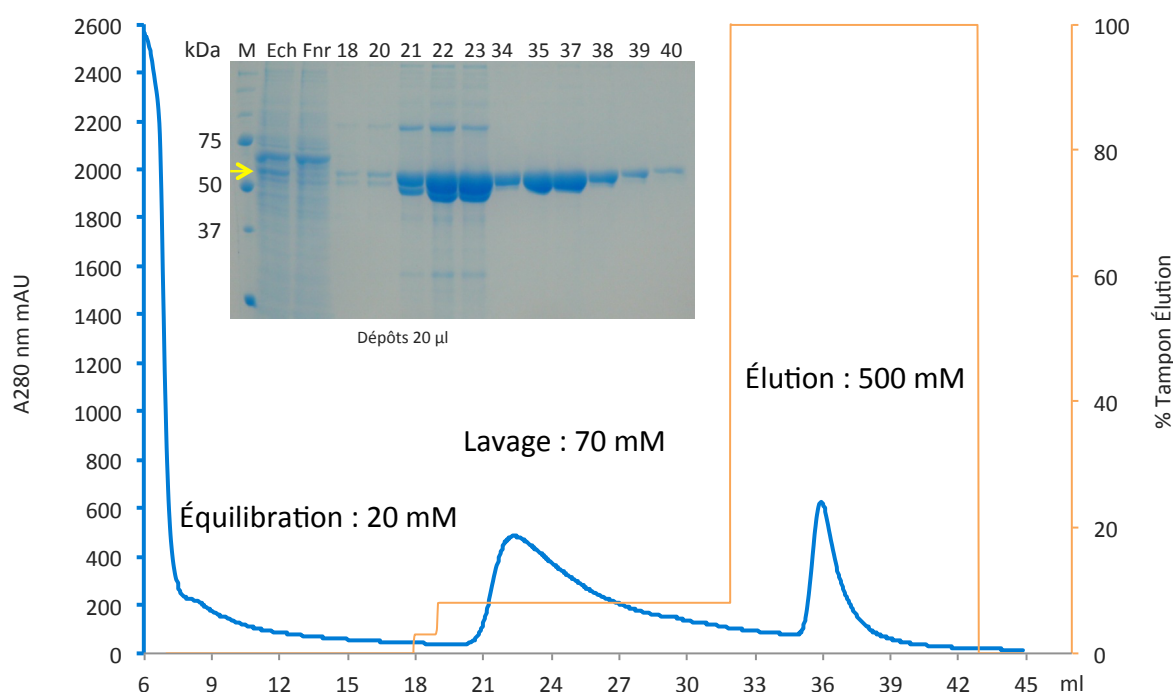


Figure III.2 : Purification d'AtFuT1 sur colonne HisTrap™ excel (GE) à partir de 740 ml de milieu Ex-Cell 405

Cellules cultivées en adhérence. Le surnageant de milieu de culture a été concentré à 200 ml par lyophilisation et dialysé. L'échantillon dialysé est ensuite injecté en boucle sur la colonne (1 ml) avec un débit de 1,25 ml/mn. Le profil correspond au branchement de la colonne sur l'appareil Akta prime, à l'équilibration (9 – 20 ml), au lavage par 70 mM d'imidazole (20-32 ml) et à l'élution par 500 mM d'imidazole (32-43 ml). Des fractions de 1 ml sont collectées au moment des étapes de lavage et d'élution et analysées sur gel SDS-PAGE 10% acrylamide. Me : échantillon avant injection sur la colonne ; Fnr, fraction non retenue sur colonne. Coloration des protéines au bleu de Coomassie.

L'analyse des différentes fractions en SDS-PAGE révèle qu'AtFuT1 a pu être purifiée du milieu en quantité importante. La bande observée à la taille attendue sur le gel disparaît de la fraction non retenue (FNR) et réapparaît faiblement lors de l'étape d'équilibration.

Une partie importante de la protéine est ensuite éluée dès l'étape de lavage avec 70 mM d'imidazole. Enfin, la protéine davantage pure est obtenue en appliquant un palier à 0,5 M d'imidazole. L'activité de la protéine a été confirmée pour les deux pics (70 et 500 mM d'imidazole).

Par ailleurs, la colonne HisTrap™ excel a conservé sa couleur bleue, attestant de la présence de nickel, alors que précédemment la colonne His-Trap FF était devenue blanche en fin d'injection (figure III.3). Ceci indique que ce nouveau type de colonnes est plus adapté pour la purification d'AtFuT1 dans le milieu de culture de cellules d'insectes. La quantité de protéine obtenue par cette purification (lavage et élution) a été d'environ 3 mg en sortie d'His-trap, soit un rendement de 0,4 mg pour 100 ml de milieu.

Figure III.3 : Colonnes 1 ml HisTrap™ excel (gauche) et HisTrap FF (droite) utilisées une fois, avec le même échantillon.

La colonne HisTrap™ excel a conservé sa couleur bleue, indiquant la présence de nickel, alors que la colonne classique HisTrap FF a viré au blanc, signe que le métal a été lessivé.



Les efforts ont ensuite été portés sur la mise au point d'un protocole optimal pour la préparation de l'échantillon et la purification d'AtFuT1.

### III.3. Optimisation du protocole de purification de AtFuT1 par IMAC

Les résultats précédents ont montré l'intérêt de la résine HisTrap™ excel pour la purification d'AtFuT1 produite en milieux de culture de cellules d'insectes. Lors de la récolte, les milieux Express-five et Ex-Cell 405 se trouvent à un pH de 6,25 et 6,1, respectivement. Le fournisseur des colonnes HisTrap™ excel recommande d'employer un milieu dont le pH est ajusté à au moins 7 (idéalement un pH de 7,3) et de ne pas ajouter d'imidazole dans l'échantillon à injecter. Un protocole a donc été mis au point pour respecter ces recommandations. Principalement, le pH a été ajusté directement, pour ne plus avoir à effectuer les étapes de lyophilisation et dialyse. Tous les tests de mise au point sur de petits volumes (partie III.3.1 et III.3.2) ont été réalisés avec des échantillons de 40 ml. **En prévision du scale-up le milieu choisi a été Express-five, puisque les boîtes utilisées avec ce dernier sont environ quatre fois moins cher que celles utilisées avec Ex-Cell 405 (Cf. Chapitre II).**

### III.3.1. Importance de l'ajustement du pH du milieu de culture

Lors d'un premier essai sans ajustement du pH du milieu, aucun pic d'élution n'est apparu sur le chromatogramme et aucune protéine n'a été visible pour l'étape d'élution sur gel SDS-PAGE (non montré). Il a donc été nécessaire de déterminer un moyen d'ajuster le pH à une valeur proche de ce qui était utilisé avec la dialyse (pH 8). Dans un premier temps, le pH a été ajusté à 7,4 par de la soude (NaOH) 1M. Un précipité blanchâtre s'est immédiatement formé. Plusieurs bases faibles ont alors été comparées pour ajuster graduellement le pH du milieu Express-five à 7,4. Les solutions testées ont été : Tampon HEPES ajusté à pH 7,9 par la base NaOH, carbonate de sodium, citrate de sodium, acétate de sodium, toutes à 1 M. **Dans chaque cas, le précipité blanchâtre d'origine minérale (absence de protéines dans le précipité formé) est apparu vers un pH de 6,5.** La solution HEPES pH 7,9 a semblé la plus appropriée puisque ce tampon est utilisé dans le protocole de purification. **Il a été choisi d'éliminer le précipité par une étape de centrifugation et de filtration.**

Le protocole retenu peut se décrire brièvement de la manière suivante :

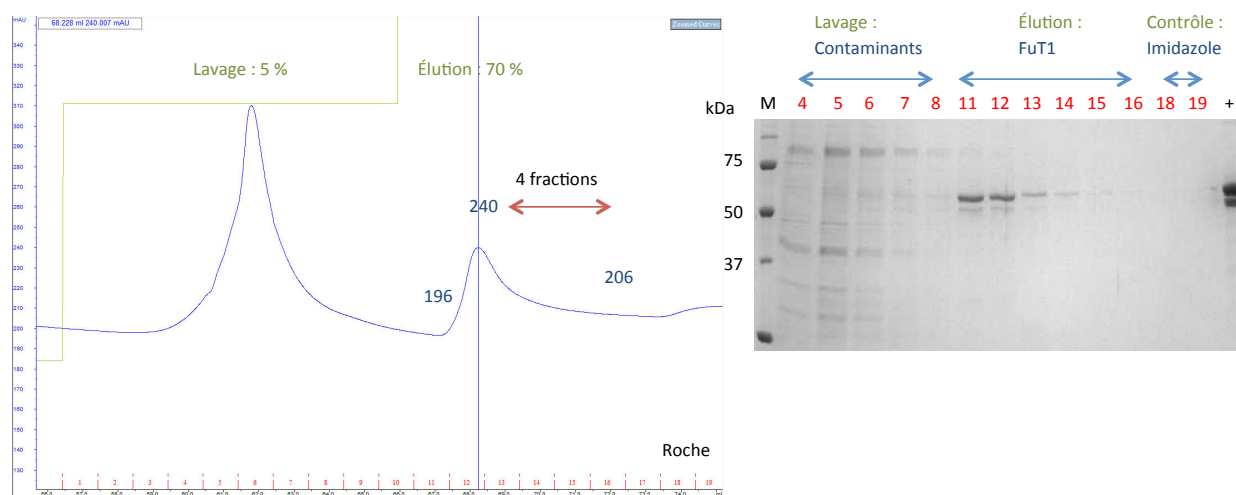
- Décongélation de surnageant (Express-five)
- Ajustement du pH à 7,4 par HEPES NaOH pH 7,9
- Repos 15 mn sur glace
- Centrifugation 10 mn (9000xg)
- Filtration 0,2 µm (seringue)
- Dégazage
- Dépôt dans la boucle de 40 ml pour injection, système Akta prime

### III.3.2. Comparaison des colonnes « HisTrap<sup>TM</sup> Excel » et « cOmplete<sup>TM</sup> HisTag »

Le protocole précédemment mis au point a été utilisé pour comparer les rendements et conditions d'élution entre les colonnes des deux fournisseurs. Ceci a été effectué dans le cadre d'une collaboration avec l'entreprise « Roche », qui a mis ses produits à notre disposition. Les paramètres observés ont été :

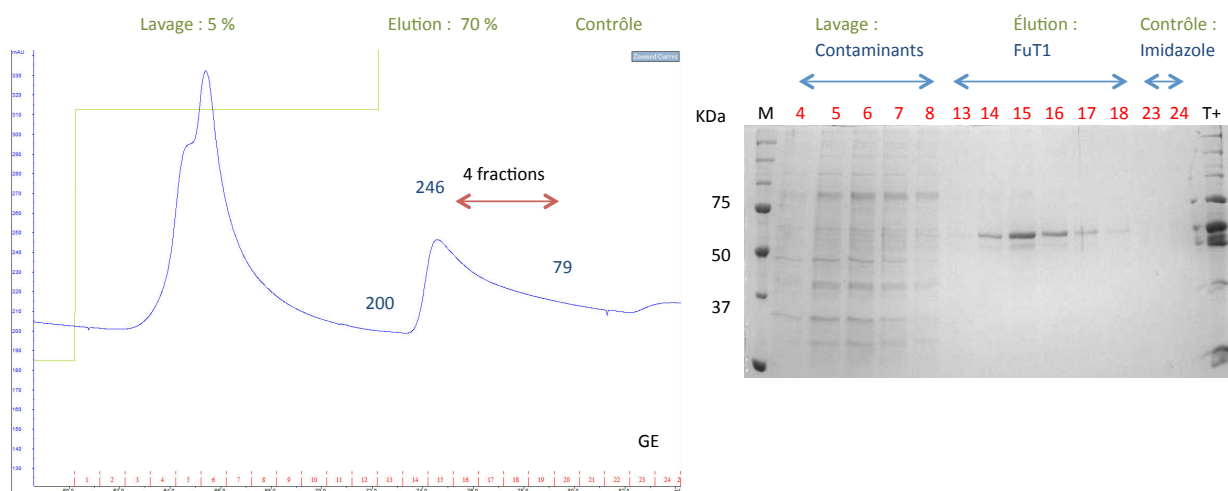
- les concentrations d'imidazole auxquelles éluent les protéines contaminantes et AtFuT1
- la pureté d'AtFuT1
- les rendements obtenus

Il est apparu dans un premier temps qu'un lavage à 10 mM d'imidazole (5 % de tampon d'élution) est suffisant dans les conditions des ces expériences pour laver la colonne des contaminants. La concentration en imidazole à laquelle élue la protéine AtFuT1 a été déterminée par un gradient de tampon d'élution de 10 à 500 mM d'imidazole. La protéine s'est décrochée majoritairement autour de 250 mM d'imidazole pour les deux colonnes (purifications non montrées). De manière à affiner le pic d'élution, un palier à 350 mM d'imidazole (70 % de tampon d'élution) a été effectué. Les profils de lavage, d'élution et les rendements de protéines ont été très similaires entre les deux colonnes (Figures III.4 et III.5).



**Figure III.4 : Purification d'AtFuT1 sur colonne cComplete<sup>TM</sup> His-Tag (Roche) à partir de 40 ml de milieu Express-five**

A gauche : palier de lavage et d'élution, Akta prime. A droite : migration des fractions d'intérêt en gel SDS-PAGE 10 % acrylamide. Contrôle imidazole = 100 % de tampon d'élution (500 mM d'imidazole) ; + = contrôle positif : environ 2 µg d'AtFuT1 purifiée précédemment. Dépôts de 20 µl, coloration au bleu de Coomassie.



**Figure III.5 : Purification d'AtFuT1 sur colonne HisTrap<sup>TM</sup> excel (GE) à partir de 40 ml de milieu Express-five**

A gauche : palier de lavage et d'élution, Akta prime. A droite : migration des fractions d'intérêt en gel SDS-PAGE 10 % acrylamide. Contrôle imidazole = 100 % de tampon d'élution (500 mM d'imidazole) ; + = contrôle positif : environ 2 µg d'AtFuT1 purifiée précédemment Dépôts de 20 µl, coloration au bleu de Coomassie.

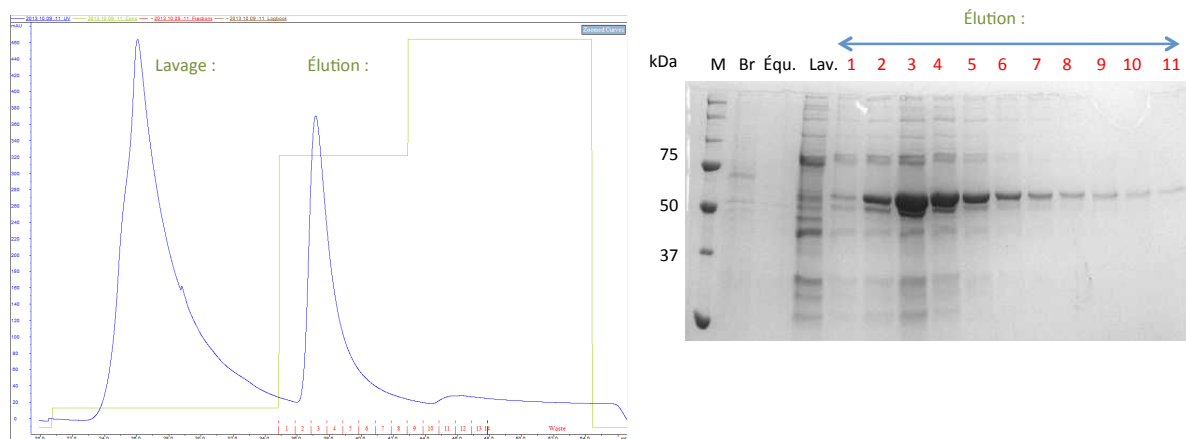
Le protocole de purification par IMAC, mis au point sur de petits volumes (40 ml), montre qu'il est possible de se débarrasser en une seule étape de la majorité des protéines contaminantes et d'obtenir une fraction suffisamment pure d'AtFuT1 pour des essais de cristallisation. Les capacités des deux colonnes testées ont semblé identiques. C'est donc le matériel de Roche : cOmplete His-Tag, qui a été utilisé pour toutes les purifications suivantes, puisque la majorité du matériel a été fourni par l'entreprise, ou vendu à des prix attractifs.

### III.3.3. Purifications à partir de volumes importants

L'objectif suivant a été de travailler avec des volumes dix ou vingt fois supérieurs pour augmenter les rendements de purification. Cependant, **la méthode mise au point sur de petits volumes n'a pas pu être transposée à de grands volumes (1 L)** et des ajustements importants ont été nécessaires. En effet, la colonne se bouche systématiquement avec le passage de 200 à 300 ml de milieu. **Le composé qui précipite lors de l'ajustement du pH continue en fait à précipiter dans le temps**, pendant au moins 24 h. Une fois présent, celui-ci colmate toute colonne employée : qu'elle soit achetée pré-remplie ou préparée au laboratoire avec de la résine en suspension.

#### ➤ Purification en milieu Express-five

Pour le milieu Express-Five, le pH n'a jamais pu être ajusté à une valeur > 6,5 sans conduire à la formation de précipité. **Lors des purifications suivantes, le pH du milieu Express-Five a été ajusté à 6,5 uniquement, soit très proche de la valeur initiale de 6,25 (Figure III.6).**



**Figure III.6 : Purification d'AtFuT1 à partir de 500 ml de milieu Express-five produits en adhérence (boîtes Nunc).**

Colonne cOmplete His-Tag, Roche. Chargement sur la nuit par pompe péristaltique. À Gauche, profile du lavage et de l'élution après branchement de la colonne sur l'appareil Akta prime. À Droite, migration des fractions d'intérêt en gel SDS-PAGE 10 % d'acrylamide. Dépôts de 20  $\mu$ l, coloration au bleu de comassie.

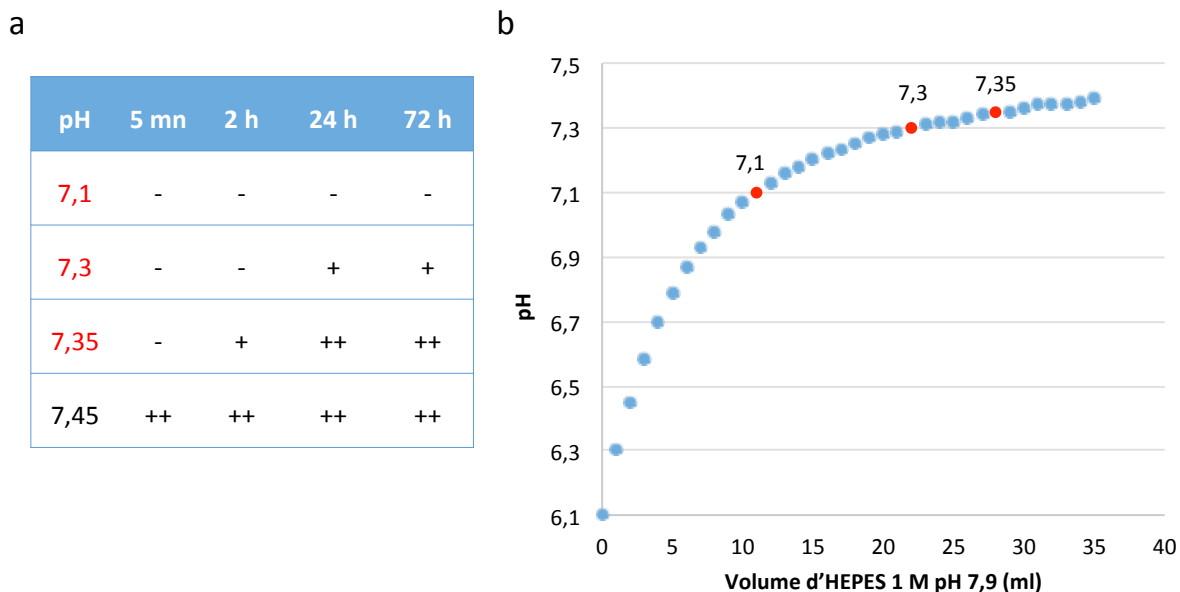
Cependant, la masse de protéine disponible en fin d'étapes de purification et de concentrations a été en moyenne de  $0,4 \pm 0,02$  mg / L. Cette quantité de protéine, obtenue en moyenne tous les 15 – 30 jours, est trop faible pour progresser efficacement dans un criblage de conditions de cristallisation. Comparé à la purification effectuée à partir de milieu Ex-Cell 405 au pH ajusté par l'étape de dialyse (Figure II.2), le rendement est environ quatre fois plus faible.

### ➤ Ajustement du pH du milieu Ex-Cell 405

Le milieu Ex-Cell 405 avait été écarté pour l'optimisation du protocole, étant donné que les boîtes utilisées pour la culture des cellules en adhésion coutent environ quatre fois plus cher que celles pour Express-Five. Cependant, **dans les conditions où le milieu Express-Five a pu être utilisé, les rendements ont été de l'ordre de quatre fois plus faibles que lors de la purification de référence : figure II.2.** Lors de cette purification, le pH du milieu Ex-Cell 405 avait été ajusté par l'étape laborieuse de dialyse, que l'on souhaite supprimer. Des essais d'ajustement du pH de ce milieu Ex-Cell 405 ont donc été effectués, afin de savoir s'il peut être utilisé dans des conditions plus favorable à la purification d'AtFuT1 par IMAC.

Les bases KOH et NaOH à 1 M ont été exclues puisqu'elles induisent l'apparition de précipité soit immédiatement (NaOH), soit en quelques heures (KOH) à un pH de 7,1. A un pH de 7,3 ces deux bases induisent la formation immédiate de précipité. L'utilisation d'HEPES 1M ajusté à pH 7,9 par la base NaOH est le plus adapté. Aucun précipité n'est observable jusqu'à un pH de 7,1 (Figure III.7). Cela correspond à l'ajout de 11 ml pour 500 ml de milieu et à une concentration en HEPES de 22 mM, très proche de celle des

tampons. Entre 7,1 et 7,3, il existe un risque que du précipité apparaisse durant les 24 heures suivantes. A un pH de 7,35 un net précipité est visible au bout de deux heures.



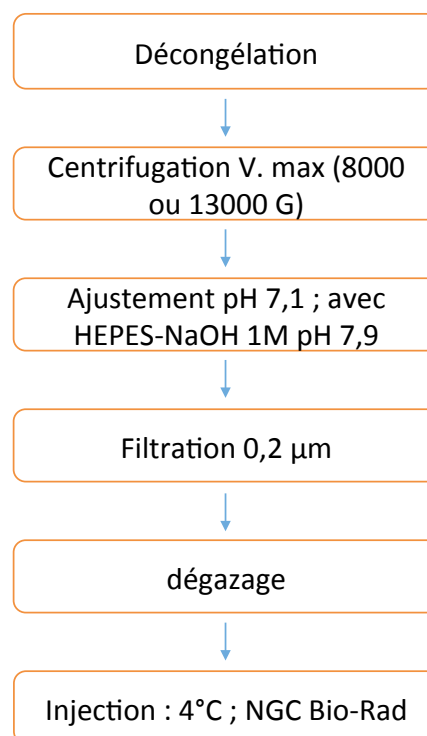
Gauche : temps auquel apparaît un précipité à différents pH, et intensité de la turbidité observée. Le milieu est conservé entre 4 et 7°C, tel que pendant une purification. Droite : ajustement de 500 ml de milieu par ajout de 1 ml d'HEPES-NaOH pH 7,9.

Afin d'être le plus proche des conditions optimales de pH pour l'étape IMAC, les essais ont été poursuivis avec le milieu Ex-Cell 405 dont le pH est ajusté à pH 7,1. Durant toutes ces phases d'optimisation dans l'étape de purification, nous avons en parallèle développé la production d'AtFuT1 par les cellules High-five cultivées en suspension dans le milieu Ex-Cell 405 (cf chapitre II). Cette méthode de production de la protéine a été doublement bénéfique, puisqu'elle a permis : (i) de produire facilement des volumes importants de milieu, et (ii) de s'affranchir du coût prohibitif des boîtes utilisées avec le milieu le plus adapté à la purification d'AtFuT1 par IMAC.

Les purifications présentées ci-dessous ont été réalisées à partir de milieu Ex-Cell 405, contenant les cellules High-Five cultivées en suspension.

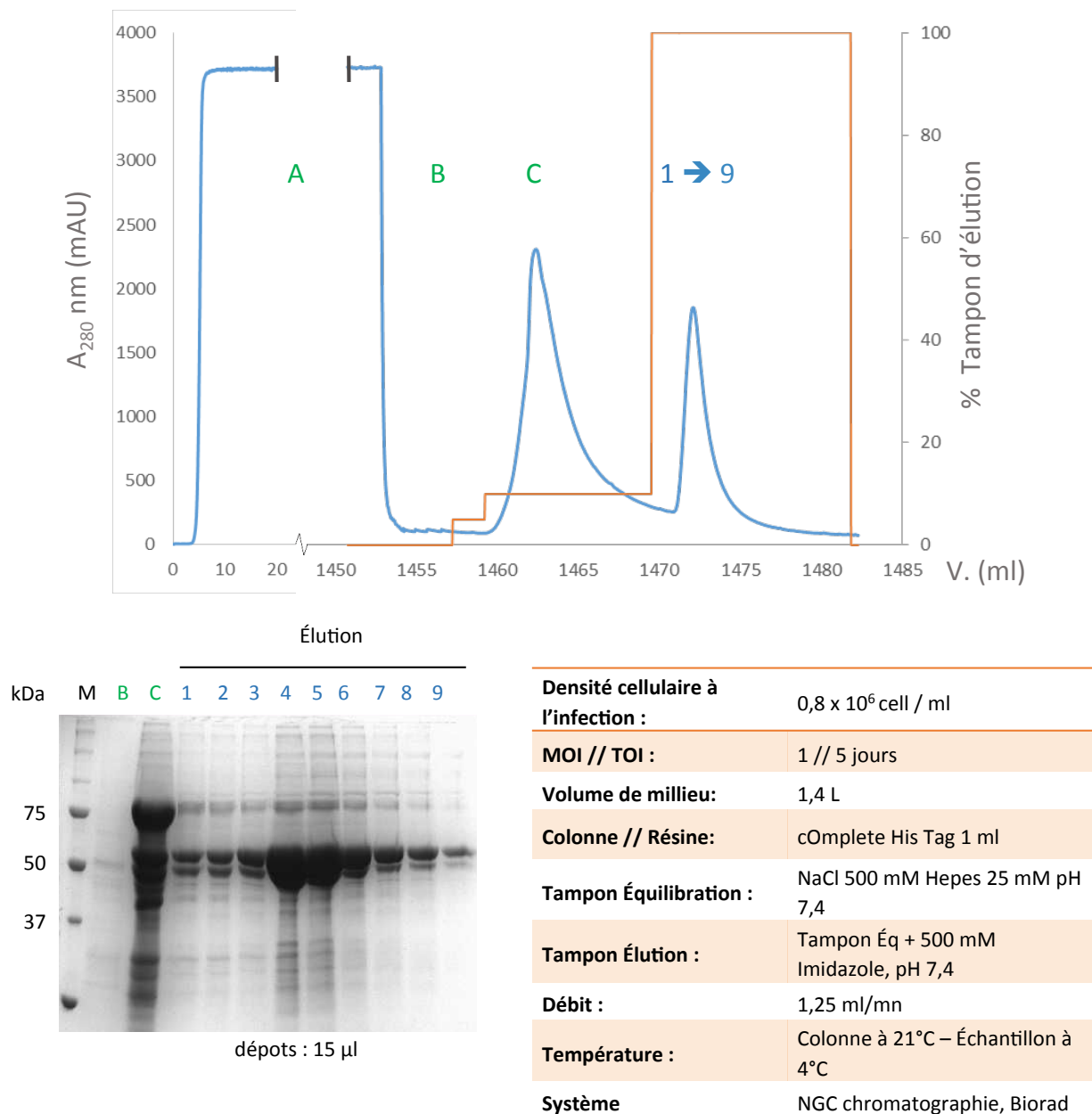
## III.4. Protocole final de purification par chromatographie IMAC

L'ensemble des étapes de préparation de l'échantillon à partir de surnageant de milieu de culture conservé à -80°C est représenté [figure III.8](#). La centrifugation est toujours effectuée à la vitesse maximale de la centrifugeuse et des godets utilisés. Cela permet de se débarrasser du maximum de débris cellulaire pour l'étape de filtration. Cette filtration est réalisée avec les unités de filtration Sartolab 22 µm (Sartorius). Les membranes classiquement utilisées au laboratoire (Pall) peuvent se colmater et font généralement « mousser » le milieu qui est filtré. Enfin, le dégazage du milieu pendant 10 à 15 min assure de ne pas assécher la colonne. Le flacon contenant le milieu est alors placé dans la glace pendant toute la période de l'injection. L'échantillon est conservé à 4°C pendant l'injection à travers la colonne (celle-ci est fixée sur l'appareil à température ambiante). Le filtrat d'injection est recueilli dans un autre récipient maintenu à 4°C.



**Figure III.8 :** Étapes de préparation de l'échantillon à partir de la décongélation du milieu et jusqu'à l'injection.

Ce protocole permet de traiter le plus efficacement et de manière la plus reproductible possible une production de protéine en milieu de culture Ex-Cell 405 ([figure III.9](#)).



**Figure III.9 : Purification typique d'AtFuT1 à partir de 1,4 L de milieu de culture Ex-Cell 405**

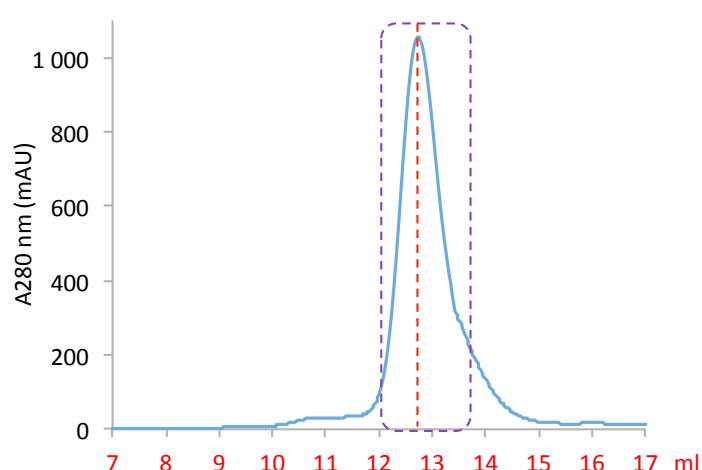
Cellules High-five cultivées en suspension. En haut : l'injection (A) est réalisée pendant la nuit avec le système « NGC chromatography » (Biorad). Les concentrations en éluant (Imidazole) sont de 0 mM pour l'équilibration (B), 50 mM pour le lavage (C) et 500 mM pour l'élution (F 1 → 9). Les fractions (1 ml) correspondant au pic d'élution (1 à 9) sont regroupées et concentrées pour la purification suivante. En bas à gauche : analyse de 15 µl de chaque fraction d'intérêt en gel SDS-PAGE 10 %. En bas à droite : principaux paramètres de cette production et purification.

Le lavage à 50 mM d'imidazole correspond au compromis pureté/quantité de protéine choisi. Le palier induisant l'élution est finalement de 500 mM d'imidazole, de manière à centrer au maximum le pic d'élution. Le gel d'acrylamide permet de contrôler la pureté

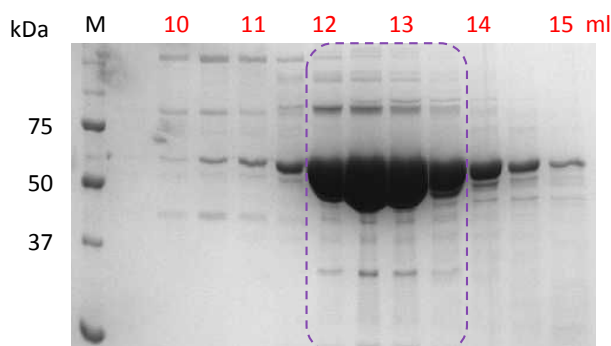
des fractions pour déterminer celles à regrouper. Le mélange des fractions sélectionnées (ici 9 ml : fractions 1 → 9) est alors concentré pour purifier une seconde fois AtFuT1, par filtration sur gel. Sur le profil électrophorétique de la [figure II.9](#), on voit nettement deux bandes protéiques dans le pic d'élution, correspondant à des Mr de 59 000 et 63 000. Ce point sera discuté dans le paragraphe suivant.

## III.5. Filtration sur gel

Pour améliorer la pureté de la préparation d'AtFuT1, une seconde étape de purification a été effectuée. Les fractions sélectionnées en sortie d'His-Trap sont rassemblées et concentrées à 500  $\mu$ l (quel moyen utilisé). L'échantillon est alors injecté sur une colonne de filtration sur gel pour séparer les protéines en fonction de leurs rayons hydrodynamiques. Cette étape permet également d'obtenir une estimation de la masse moléculaire d'AtFuT1 en solution, et de se débarrasser de l'imidazole par le changement de tampon. Des fractions de 0,5 ml sont récoltées et analysées par SDS-PAGE ([figure III.10](#)).



|                      |                                  |
|----------------------|----------------------------------|
| Colonne :            | Superdex 200 10/300 GL           |
| Échantillon :        | Élution HisTrap AtFuT1Δ68        |
| Volume échantillon : | 500 $\mu$ l                      |
| Débit :              | 0,5 ml / mn                      |
| Tampon d'élution :   | HEPES 25 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4 |
| Volume fractions :   | 0,5 ml                           |
| Température :        | 21°C                             |
| Système :            | Äkta Prime                       |



SDS-PAGE 10 %, dépôts : 15  $\mu$ l

**Figure III.10 : Purification d'AtFuT1 par chromatographie d'exclusion de taille.**

L'échantillon injecté provient d'une purification sur HisTrap (cOMplete HisTag, Roche) d'AtFuT1 à partir d'un litre de milieu Ex-Cell 405 (cellules High-five cultivées en suspension). Le centre du pic d'élution apparaît à 12,7 ml (pointillés rouges), ce qui correspond à une protéine globulaire d'environ 150 kDa. Les fractions de la partie la plus centrée et symétrique du pic (pointillés violets) sont rassemblées pour être concentrées ou directement utilisées.

La filtration sur gel élimine d'autres contaminants protéiques. Notamment, de contaminants de poids moléculaire important sont visibles aux volumes d'élutions de 10 à 11,5 ml. L'intensité des bandes correspondant à la protéine AtFuT1 représente plus de 95 % de leurs pistes. AtFuT1 élue à un volume correspondant à une protéine globulaire de masse moléculaire estimée à 150 kDa, d'après la courbe de calibration réalisée sur ce type de colonne. Ce volume d'élution indique que la protéine en solution est très probablement sous forme d'un dimère. En sortie de cette purification, les fractions sélectionnées (cadre pointillé [figure III.10](#)) sont mesurées au Nanodrop puis rassemblées. La protéine est alors concentrée selon les besoins : 1 ou 2 mg/ml pour des tests biochimiques et enzymatiques et jusqu'à 10-15 mg/ml pour les essais de cristallisation. La concentration de la protéine se fait par centrifugation avec des tubes à double fond (Centricon, 50 ml), dont la membrane poreuse laisse traverser le tampon et les particules inférieures à 14 kDa. Les échantillons sont conservés à -20°C.

**En conclusion :** une purification type d'AtFuT1 produite dans 1L de milieu Ex-cell 405, à partir de cellules High-five en suspension, permet d'obtenir en sortie d'IMAC environ 3 mg de protéine et après filtration sur gel et concentration environ 2 mg. AtFuT1 se comporte en dimère en solution. Elle peut être concentrée jusqu'à 10-15 mg/ml sans aggrégation. La caractérisation biochimique de AtFuT1 purifiée est l'objet du paragraphe suivant. Ce protocole devrait désormais servir de base solide pour la purification de nouvelle GT d'intérêt.

---

## **Chapitre IV : Caractérisation biochimique d'AtFuT1**

---



# IV. Caractérisation biochimique d'AtFuT1

## IV.1. Activité enzymatique d'AtFuT1 purifiée

### IV.1.1. Un nouveau test de dosage d'activité

L'activité de l'enzyme, après l'ensemble de ces étapes de purifications et concentrations, a régulièrement été vérifiée par la mesure du transfert de fucose radiomarqué sur du xyloglucane (cf principe du dosage [figure II.4](#)). Dans le cadre de la mise sur le marché d'un nouveau produit de dosage d'activité glycosyltransférase par Promega, le GDP-Glo™ Glycosyltransferase Assay, les paramètres cinétiques d'AtFuT1 ont pu être mesurés par une technique basée sur l'émission de bioluminescence. Ce test alternatif à la radioactivité a notamment permis de calculer les valeurs de la constante de Michaelis ( $K_m$ ) et de la constante catalytique ( $k_{cat}$ ) de l'enzyme purifiée pour ses substrats (GDP-fucose et xyloglucane). Ce travail a été effectué avec un double objectif:

- Evaluer, pour notre laboratoire, l'intérêt de ce nouveau test d'activité glycosyltransférase, et sa mise en œuvre pour des calculs de cinétiques
- Comparer les valeurs obtenues pour l'enzyme tronquée et purifiée à celles mesurées par radioactivité au laboratoire pour AtFuT1 $_{\Delta 68}$  et aux données de la littérature pour l'enzyme native

Le principe de ce test repose sur une transformation enzymatique du nucléotide diphosphate libéré par la réaction GT, en ATP qui devient alors le substrat d'une luciférase. Cette luciférase génère une luminescence proportionnelle au NDP formé, qui est détectée par un luminomètre. Chaque type de nucléotide nécessite une enzyme spécifique pour être transformé en ATP : « UDP-Glo » pour l'UDP et « GDP-Glo » pour le GDP ([figure IV.1](#)).

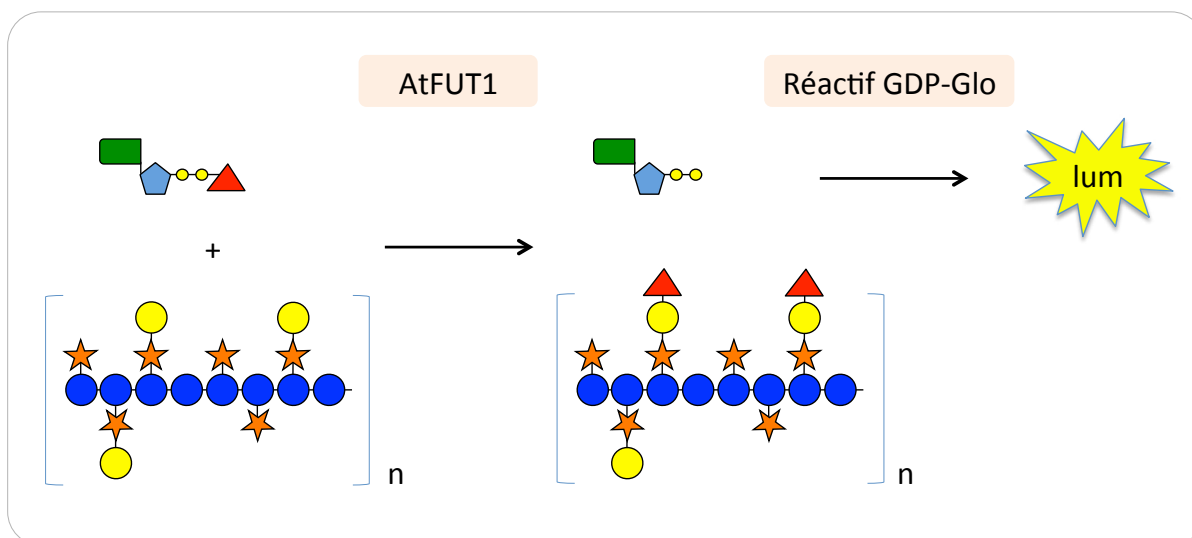
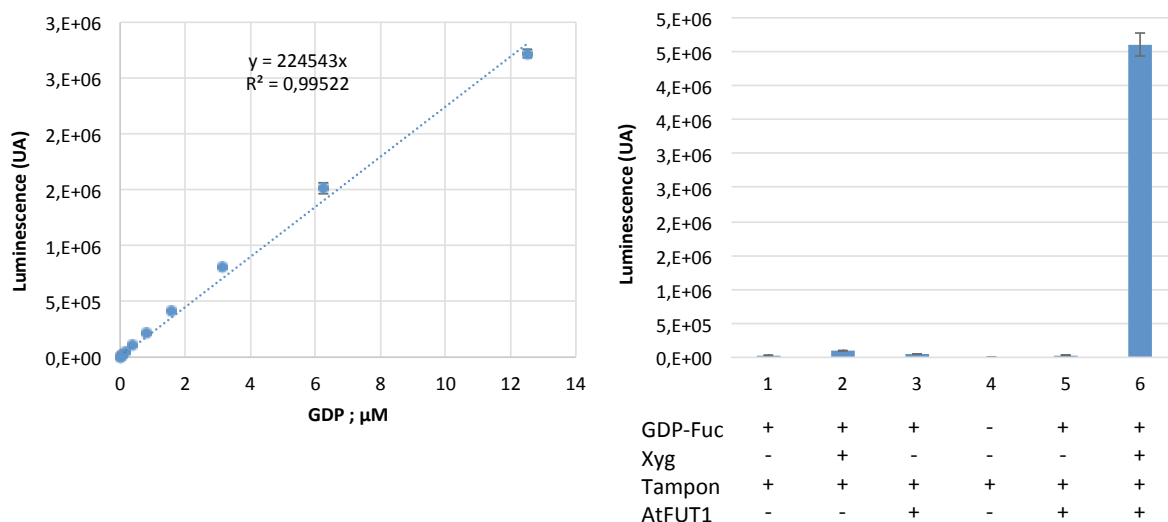


Figure IV.1 : Principe du kit « GDP-Glo™ Glycosyltransferase Assay » de Promega.

La réaction de transfert du fucose à partir de GDP-fuc (en haut à gauche sur la figure) sur du xyloglucane par AtFuT1 libère du GDP qui est ensuite dosé, dans un second temps, par le réactif GDP-Glo. L'ajout du réactif GDP-Glo dans le puits arrête la réaction GT. Le principe du dosage est la conversion du GDP en ATP qui génère un signal bioluminescent sous l'action de la luciférase. Le substrat xyloglucane est représenté par le motif XLLGXXLG (Notation de Fry 1993, figure I.17).

Des tests pour quantifier l'UDP sont déjà commercialisés à ce jour et nous avons été l'un des premiers clients à utiliser le kit GDP-Glo. Intéressée par un retour d'informations d'utilisateurs sur ce produit, l'entreprise Proméga nous a fourni l'ensemble des réactifs et le luminomètre (GloMax, Promega) nécessaires aux essais avec ce kit. Parmi ces réactifs, le « GDP-fucose ultra-pure » permet de limiter le bruit de fond induit par la présence de GDP.

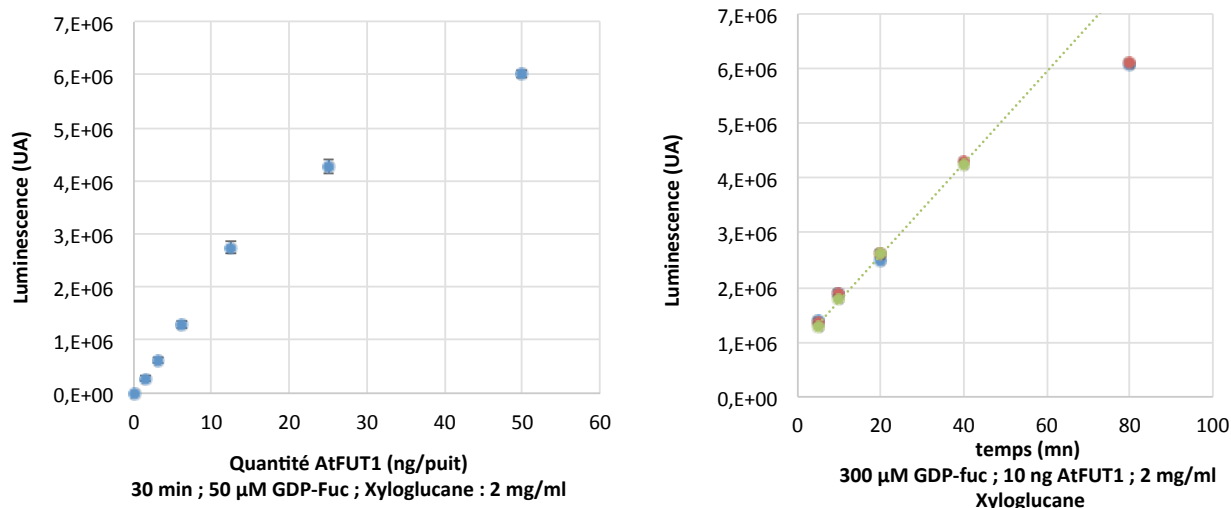
Dans un premier temps, une courbe d'étalonnage de GDP a permis de déterminer le seuil de détection, sa linéarité et son amplitude. Les gammes de concentration des substrats GDP-fucose et xyloglucane utilisées pour les tests d'activité d'AtFuT1 ont été définies par rapport aux données de la littérature et des tests d'activité préalablement réalisés au laboratoire par dosage radioactif. Typiquement, les valeurs utilisées doivent encadrer la valeur de  $K_m$  ( $0,2$  à  $10 \times K_m$ ). La concentration en enzyme et le temps de réaction ont été optimisés, de manière à ce que les mesures cinétiques de l'enzyme soient en conditions de vitesse initiale. Des contrôles ont été effectués pour s'assurer que les réactifs ne soient pas contaminés (notamment le GDP-fucose par du GDP libre), et que la réaction de transfert de fucose n'ait bien lieu qu'en présence des trois éléments nécessaires : l'enzyme, l'accepteur et le donneur (Figure IV.2). Enfin, les paramètres cinétiques : vitesse maximale ( $V_{max}$ ) et constante de Michaelis ( $K_m$ ) ont été déterminés. Toutes ces expériences ont été effectuées dans les mêmes conditions (voir chapitre VIII : Matériel et Méthode), en tampon de stockage de l'enzyme (HEPES 25 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4).



**Figure IV.2 : Sensibilité, bruit de fond et gamme de détection du test d'activité d'AtFuT1 avec GDP-Glo.**

A gauche : courbe standard de GDP (Promega). Chaque point de la gamme est effectué en triplicata, la moyenne est représentée avec l'écart-type. A droite : Détection de GDP dans les conditions des expériences effectuées. Les réactifs, lorsque présents (+) sont aux concentrations suivantes : GDP-Fuc 300  $\mu\text{M}$ , Xyloglucane 4mg/ml, AtFuT1 10 ng/réaction (25  $\mu\text{l}$ ). Ces composés ont été laissés 20 mn à température ambiante avant d'ajouter le réactif du kit.

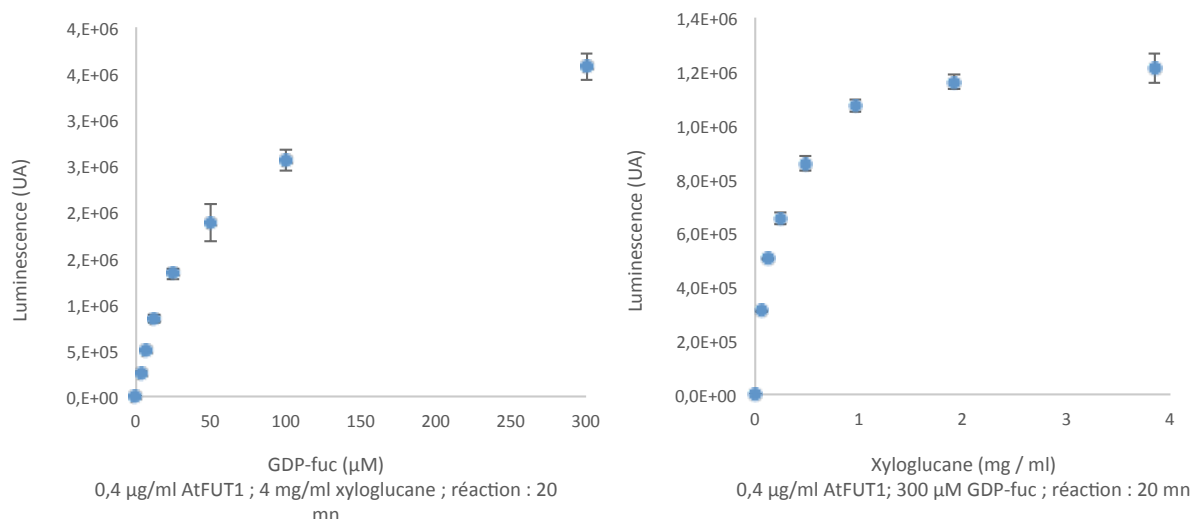
Le seuil de détection du GDP est de 20 nM, avec une réponse linéaire jusqu'à 12,5  $\mu\text{M}$  (Figure IV.2). Lors des tests suivants, une bonne linéarité de réponse est observée jusqu'à 25  $\mu\text{M}$  en GDP. Ce test permet d'obtenir des mesures très reproductibles au sein d'une gamme de concentration de GDP allant de 1 à 1000. Les contrôles montrent qu'aucun des réactifs n'est contaminé et que le transfert de fucose, libérant du GDP, se fait bien en présence de l'enzyme et de ses deux substrats uniquement (Figure IV.2). La concentration d'AtFuT1 et le temps de réaction ont été déterminés lors des expériences présentées dans la figure IV.3. L'objectif est de travailler avec une concentration d'AtFuT1 et un temps suffisamment faible pour que la vitesse de la réaction ne soit pas ralentie par le manque de l'un des substrats.



**Figure IV.3 : Détermination de la concentration d'AtFuT1 et du temps de réaction pour les tests d'affinités.**

Signal mesuré en fonction : à gauche, de la concentration d'enzyme ; à droite, du temps de réaction (xyloglucane : 2 mg/ml). Mesures effectuées en triplicata, volume final 25  $\mu$ l.

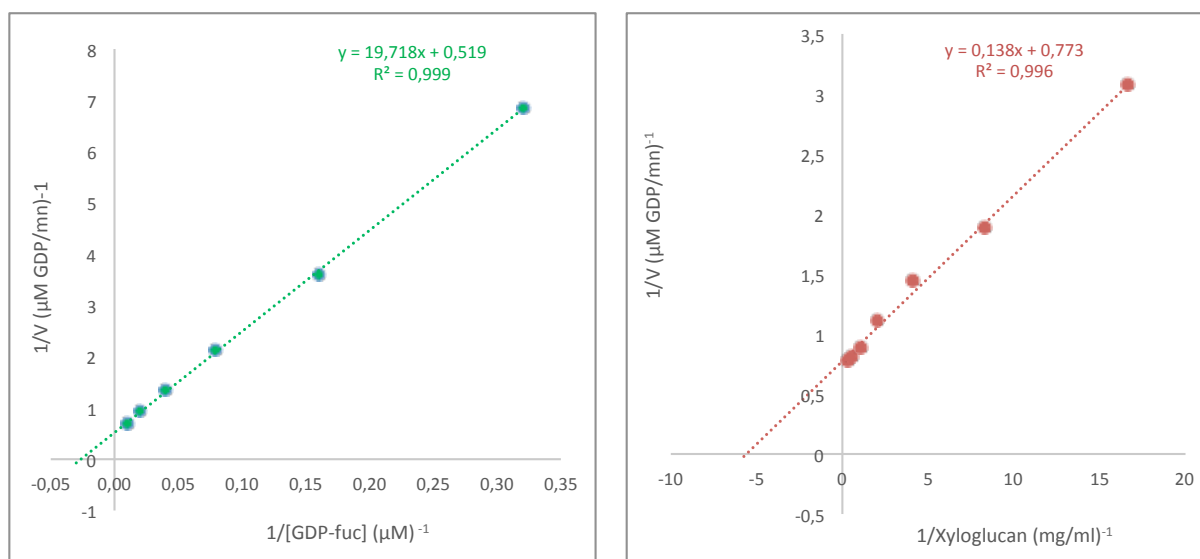
La concentration d'enzyme et le temps de réaction ont été choisis de manière à transformer moins de 20 % du substrat disponible durant la réaction (respect des conditions de vitesse initiale). Une concentration de 0,4  $\mu$ g/ml d'enzyme (10 ng par puits) et un temps de 20 mn induisent dans ces conditions une luminescence d'un peu moins de  $3 \cdot 10^6$  (Unité Arbitraire). Cela correspond à environ 15  $\mu$ M GDP (courbe standard [figure IV.2](#)), soit 5 % des 300  $\mu$ M de GDP-Fuc fournis. Des mesures de vitesses initiales en variant les concentrations de donneur et d'accepteur ont été effectuées dans ces conditions ([Figure IV.4](#)). Quand l'un des substrats est utilisé à des concentrations variables, la concentration de l'autre est maintenue constante à une valeur d'environ  $10 \times K_m$  (soit 300  $\mu$ M pour le GDP-fucose et 4 mg/ml pour le xyloglucane).



**Figure IV.4 : Mesures de vitesses initiales à différentes concentrations de substrats.**

La luminescence mesurée correspond à une concentration de GDP formé en 20 mn de réaction. À gauche : variation des concentrations du donneur (GDP-Fucose). À droite : variation des concentrations de l'accepteur (xyloglucane). Chaque réaction est effectuée en triplicata, représentation des moyennes et écart-types.

Les valeurs de luminescence sont converties en concentration de GDP, de manière à exprimer la vitesse ( $V$ ) en  $\mu\text{moles}$  de produit formé par minute, pour chaque condition. La vitesse maximale ( $V_{\text{max}}$ ) et la constante de Michaelis ( $K_m$ ) pour chacun de ses substrats sont déterminées par la méthode des graphes en double inverse de Lineweaver-Burk : représentation  $1/V$  en fonction de  $1/[S]$ . Les équations des droites obtenues servent à estimer les valeurs de  $V_m$  et  $K_m$  de l'enzyme pour ses substrats (Tableau IV.1 et IV.2).  $1/V_m$  correspond à l'intersection de l'ordonnée ( $x=0$ ), et  $-1/K_m$  à l'intersection de l'abscisse ( $y=0$ ).



**Figure IV.5 : Détermination des paramètres cinétiques par la représentation en double inverse  $1/V$  et  $1/[S]$**

A gauche : Variation des concentrations du donneur GDP-fuc. À droite : variation des concentrations d'accepteurs. Chaque point correspond à la moyenne d'essais en triplicata.

Les estimations de  $K_m$  et  $V_{max}$  sont respectivement :

- de 42  $\mu M$  et de 12  $M \times h^{-1} \times mg^{-1}$  d'enzyme pour le GDP-fuc
- de 0,17 mg/ml et 9  $M \times h^{-1} \times mg^{-1}$  d'enzyme pour le xyloglucane

Les valeurs obtenues par Faik *et al* avec l'enzyme PsFuT1 native, purifiée à partir d'extraits de pois, sont données dans le [Tableau IV.1](#).

**Tableau IV.1 : comparaison des valeurs de  $K_m$  et  $V_{max}$  obtenues à celles de la littérature**

Les valeurs obtenues pour AtFuT1 tronquée et purifiée sont comparées à celles de PsFUT1 native, partiellement purifiée à partir d'extraits de poids. Dans le premier cas les mesures ont été faites par la technique de luminescence GDP-Glo et dans le deuxième par les tests de radioactivité.

| Molécule :  | GDP-fuc           |                                                | xyloglucane   |                                                |
|-------------|-------------------|------------------------------------------------|---------------|------------------------------------------------|
| Paramètre : | $K_m$ ( $\mu M$ ) | $V_{max}$ ( $M \times h^{-1} \times mg^{-1}$ ) | $K_m$ (mg/ml) | $V_{max}$ ( $M \times h^{-1} \times mg^{-1}$ ) |
| AtFuT1      | 42                | 12                                             | 0,17          | 9                                              |
| PsFUT1      | 30                | 0,15                                           | 0,46          | 0,2                                            |

Les valeurs de  $K_m$  obtenues par le test GDP-Glo pour AtFuT1 sont proches de celles obtenues avec la PsFUT1 (Faik, Bar-Peled, et al., 2000). En revanche les valeurs de  $V_{max}$  pour AtFuT1 sont environ 80 et 45 fois plus fortes pour le GDP-Fuc et le xyloglucane, respectivement, en comparaison des valeurs de PsFUT1.

La construction His-AtFuT1 $_{\Delta 68}$  est donc active après les étapes de purifications et concentration à 1 mg/ml, puis stockage six jours à -20°C.

## IV.1.2. Conservation de la protéine

Le niveau d'activité a été comparé entre deux lots différents, stockés à -20°C : l'un purifié trois mois plus tôt et l'autre deux jours avant la mesure. Chacun d'entre eux a été concentré à 1 et 7 mg/ml. Les conditions des mesures sont : 0,4  $\mu g/ml$  d'AtFuT1; 100  $\mu M$  de GDP-fuc ; 2 mg/ml de xyloglucane ; 20 mn.

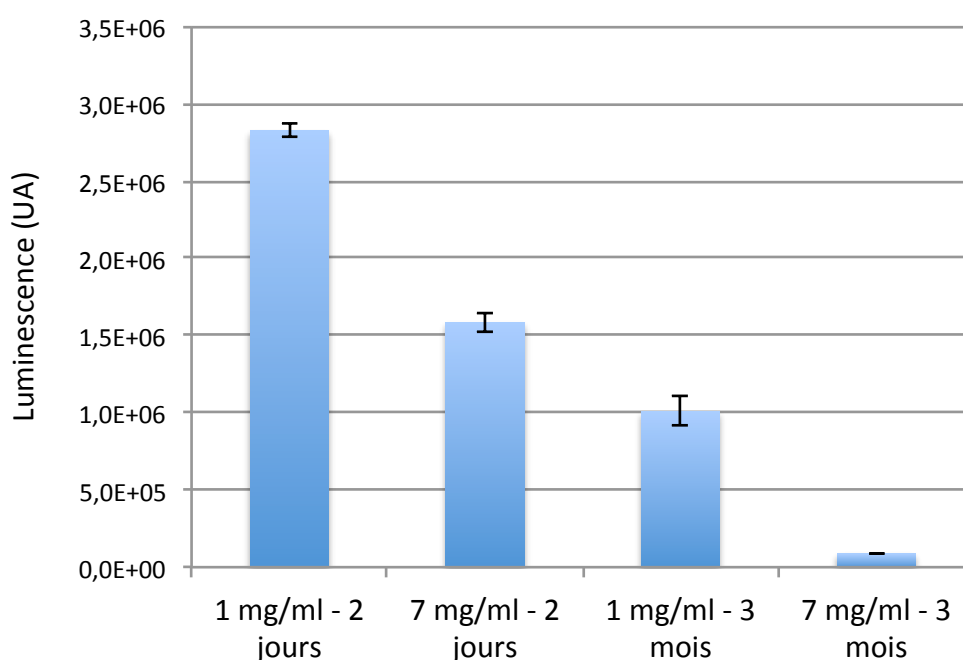


Figure IV.6 : Comparaison de l'activité de différents lots d'AtFuT1

Les mesures d'activités ont été effectuées sur deux lots d'AtFuT1 : l'un produit et congelé 3 mois auparavant et l'autre deux jours avant la mesure, à -20°C aux concentrations indiquées.

Ces données montrent que la concentration de la protéine et la durée de conservation (à -20°C) influent beaucoup l'activité de AtFuT1. Il serait utile de répéter l'expérience avec un stockage à -80°C, voir d'optimiser le tampon de conservation. À l'issue de ces résultats, les tests de biochimie ont été effectués avec des préparations fraîches d'enzyme.

### IV.1.3. Test de transfert sur des oligosaccharides

Le xyloglucane utilisé précédemment dans les tests d'activité est un polysaccharide issu de graines de tamarin, dont la masse moléculaire est estimée à environ 500 000. Rappelons que le XyG est constitué de la répétition de divers motifs (XXXG, XLXG, XXLG, XLLG,...) en proportions variables (cf Figure I.17). Il est cependant admis pour le XyG de tamarin que 85% des motifs tétrasaccharidiques sont de type XXLG et XLLG. Ces motifs comportent chacun un accepteur : le galactose de la substitution (L) précédent le (G). Dans le cadre de cette étude sur AtFuT1, quelques tests préliminaires ont été effectués dans le but de savoir quelle est la longueur minimale du XyG pouvant servir d'accepteur à AtFuT1. Deux types d'oligosaccharides potentiellement accepteurs ont été testés. Il s'agit des fragments « XLLGXLLG » et « XLLG », utilisés à la même concentration massique que le xyloglucane : 2,5 mg/mL. Cette expérience a été effectuée avec le test d'activité basé sur l'utilisation de GDP-<sup>14</sup>C-fucose radiomarké. Le taux de transfert sur

les deux oligosaccharides a été comparé au taux de référence (100%) observé avec le xyloglucane (Tableau IV.2).

**Tableau IV.2 : pourcentage d'activité fucosyltransférase d'AtFuT1 avec différents accepteurs**

Les accepteurs ont été utilisés à la même concentration massique : 2,5 µg / µL. Chaque test a été effectué en duplicata.

| Accepteur  | Xyloglucane | XLLGXLLG | XLLG |
|------------|-------------|----------|------|
| Masse (Da) | 500 000     | 2476     | 1247 |
| Activité % | 100         | 5        | 0    |

Les fragments de tailles minimales (XLLG) n'ont pas permis de détecter une activité de transfert dans les conditions de l'expérience. Seulement 5 % de l'activité de référence de l'enzyme a été observée avec le motif XLLGXLLG. Il semblerait que ce soit le motif minimal nécessaire pour l'activité de transfert. Il s'agit cependant de résultats préliminaires. Ces tests devront être répétés avec de l'enzyme fraîchement purifiée, si possible avec le système de mesure GDP-Glo et du GDP-Fucose hautement purifié (Promega).

## IV.2. Etude du comportement d'AtFuT1 par DLS

Des échantillons issus des différentes étapes de purifications ont régulièrement été analysés par la technique de diffusion dynamique de la lumière (DLS), aussi appelée « spectroscopie par corrélation de photons », voire « diffusion quasi-élastique de la lumière (DQEL) ». Cette technique analyse le mouvement des particules en solution. Elle est non destructive et s'applique à des objets de taille entre 1 nanomètre et 1 micromètre. Différents traitements mathématiques extraient ensuite des informations sur leurs masses et leurs tailles. Notamment, la distribution des objets en fonction de leur taille permet de vérifier la monodispersité d'un échantillon.

En ce qui concerne la cristallisation, cette technique est couramment utilisée pour vérifier que la protéine n'a pas tendance à s'agréger. Le paramètre observé est alors le « pourcentage de polydispersité » : cette valeur correspond à la largeur à mi-hauteur de la distribution gaussienne d'une population donnée. Un échantillon de protéine purifiée est qualifié de « monodisperse » si ce pourcentage est inférieur à 20. Même inférieur à 30, il indique une probabilité élevée que la protéine cristallise. (Bergfors T, 2009). Pour cette étude, le DLS est donc simplement utilisé comme « contrôle qualité » de l'échantillon aux différentes étapes de purification, stockage et concentration de la protéine d'intérêt.

Les échantillons d'AtFuT1 ont dans un premier temps été analysés en sortie d'His-Trap et de purification par filtration sur gel. Cette deuxième purification précède l'étape de concentration d'AtFuT1 à 7 mg/ml, pour effectuer les tests de cristallisation. L'une des questions pratiques est de savoir s'il est impératif de concentrer la protéine et d'effectuer les tests de cristallisation immédiatement après sa purification, ou s'il est possible de la conserver quelques jours. Pour répondre à cela, un même échantillon conservé à 4°C a été analysé toutes les 24h, pendant 10 jours. La concentration peut aussi induire la précipitation d'une partie significative de la protéine. L'état d'AtFuT1 a donc été analysé après l'avoir concentrée à 7 mg/ml, comme pour les tests de cristallisation et conservée pendant deux jours. Dans les deux cas, l'échantillon est stocké à 4°C. Les mesures présentées figures IV.7 ont été effectuées avec l'appareil zetasizer Nano ZS (Malvern). Les mêmes paramètres de mesures et la même cuve ont été utilisés, avec une protéine AtFuT1 diluée à 0,7 mg/ml, dans son tampon de stockage.

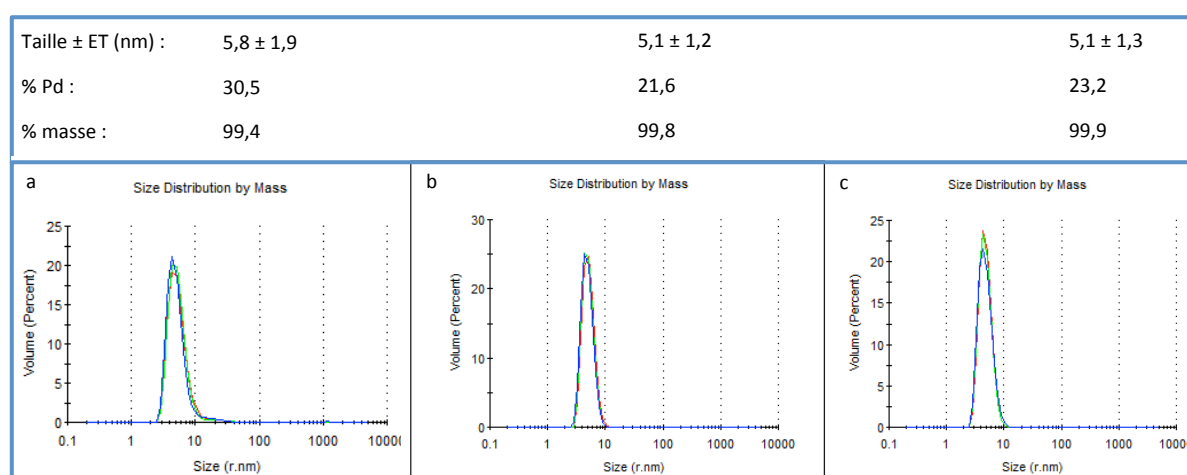


Figure IV.7 : Contrôle d'échantillons d'AtFuT1 purifiée par DLS

Mesures de diffusion de la lumière sur trois échantillons d'AtFuT1 : distribution des particules en fonction de leur masse. a) en sortie de purification par affinité (His-Trap). b) après 10 jours de conservation à une concentration de 0,7 mg/ml. c): après deux jours de conservation à 7 mg/ml puis dilution à 0,7 mg/ml pour la mesure.

En sortie de purification His-trap, un seul pic très majoritaire est observé, correspondant à plus de 99 % en masse des protéines de l'échantillon (figure 4.7, a). Ceci confirme les observations par gel : le niveau de pureté de la protéine est déjà important à cette étape. Le pourcentage de polydispersité (Pd) est de 30 en moyenne, soit relativement élevé pour effectuer des tests de cristallisation. La filtration sur gel permet d'améliorer cette valeur, qui diminue alors à environ 22 %. La figure IV.7 b correspond à l'échantillon après filtration sur gel (à 0,7 mg/ml) conservé 10 jours à 4°C. Les valeurs de taille et Pd montrent que la protéine ne tend pas à s'agréger ni à se dégrader et qu'elle peut se conserver plusieurs jours à cette température. Ces valeurs sont aussi très similaires avec l'échantillon de protéine concentrée, puis diluée pour la mesure deux jours après (figure IV.7c).

Globalement, ces tests montrent : (i) que la protéine purifiée est stable en solution, (ii) qu'elle se trouve sous la forme d'une population très homogène et (iii) qu'elle peut être conservée plusieurs jours et concentrée aux valeurs souhaitées pour effectuer le criblage de conditions de cristallisation.

### IV.3. Caractérisation des deux formes purifiées

Lors de la filtration sur gel, la taille à laquelle AtFuT1 élue principalement correspond à un état en dimère. Cette observation est cohérente avec une étude menée par *Bimolecular Fluorescence Complementation* (BiFC) sur cette enzyme (Y.-H. Chou et al., 2014). Cependant, cette dernière étude a également abouti à la conclusion que l'état de dimérisation serait dû à au moins un pont disulfure inter-chaîne, ce qui dans notre cas reste à établir. Jusqu'alors, les analyses de la protéine AtFuT1 en SDS-PAGE que nous avons effectuées étaient en conditions dénaturantes et réductrices, ce qui ne permet pas d'identifier la présence de ponts disulfures entre deux monomères.

Par ailleurs, deux bandes correspondant à la taille d'AtFuT1 monomérique sont observées en SDS-PAGE, avec une différence de taille d'environ 6 kDa. En filtration sur gel, la forme du pic d'élution n'est pas parfaitement gaussienne (cf figure III.10). Deux hypothèses peuvent expliquer ces observations : la co-purification d'une protéine chaperonne ou partenaire et/ou une différence de modification post-traductionnelle. Des expériences de migration en SDS-PAGE en conditions réductrices (R+) et non réductrices (R-), des mesures par spectrométrie de masse, des tests de déglycosylation et un séquençage N-terminal de chacune des bandes protéiques ont été réalisés sur AtFuT1 purifiée pour déterminer le type de liaisons qui associent les monomères, ainsi que la nature précise des deux bandes protéiques.

#### ➤ Analyse SDS-PAGE

Afin de vérifier l'implication de ponts disulfures dans la dimérisation d'AtFuT1, nous avons analysé en SDS-PAGE des échantillons de protéine AtFuT1 purifiée en conditions réductrices (R+) et non réductrices (R-) (figure IV.8).

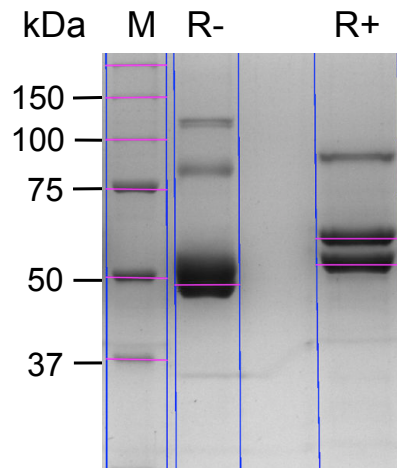


Figure IV.8 : Analyse d'AtFuT1 par SDS-PAGE en conditions réductrices (R+) et non réductrices (R-)

AtFuT1 purifiée est dénaturée en conditions réductrices (R+) et non réductrices (R-). Dépôts de 7 µg de protéine par puits, préalablement traitée ou non avec 10 % de β mercapto-éthanol pendant 10 mn. Analyse de l'image par « Image Lab ».

En conditions non-réductrices (R-), AtFuT1 migre majoritairement sous la forme d'une bande diffuse avec une masse moléculaire estimée autour de 47-50 kDa. En conditions réductrices (R+), la protéine migre clairement sous la forme de 2 bandes séparées de masses moléculaires estimées à 53 et 59 kDa. Il semble donc que la protéine AtFuT1 existe sous forme d'un dimère ne présentant pas de ponts disulfures inter-chaînes. Ce résultat contredit les données biochimiques publiées par Chou et coll (2014). Il est cependant important de noter que les constructions des deux études sont différentes : protéine tronquée du domaine transmembranaire dans notre cas et protéine complète dans leur étude.

La différence de mobilité électrophorétique de la protéine AtFuT1 en conditions réductrices et non réductrices pourrait s'expliquer par l'existence de ponts disulfures intra-chaînes, préservés dans le cas de l'échantillon non réduit. En permettant à la protéine AtFuT1 de conserver une forme davantage globulaire, ces ponts disulfures augmenteraient la vitesse de migration de la protéine. Ces ponts disulfures intra-chaînes sont d'ailleurs prédits par l'analyse de la séquence primaire avec le logiciel DiANNA (voir figure II.2).

### ➤ Déterminations de masses par MALDI-TOF

De manière à pouvoir déterminer plus précisément la masse des espèces moléculaires purifiées, plusieurs échantillons ont été analysés par MALDI-TOF (figure IV.9).

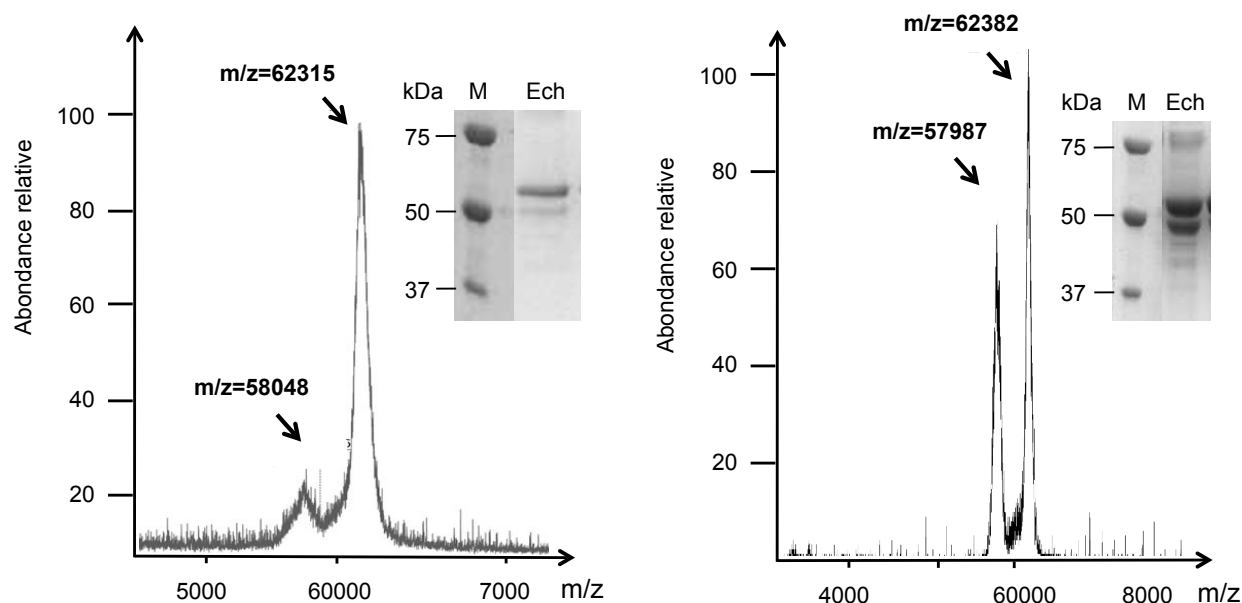


Figure IV.9 : Spectre MALDI-TOF d'échantillons d'AtFuT1.

À gauche : en sortie de purification par affinité, milieu Express-five (cf figure 3.6). A droite : en sortie de filtration sur gel, milieu Ex-cell 405.

L'analyse confirme la présence de deux espèces moléculaires de 58 kDa et 62 kDa correspondant, respectivement, aux bandes basse et haute observées en SDS-PAGE. Par ailleurs, l'analyse MALDI révèle de façon intéressante que la plus haute masse est supérieure de presque 3kDa (62,3 kDa) à celle attendue pour la construction exprimée (MM théorique 59,7 kDa). La protéine AtFuT1 possède deux sites potentiels de N-glycosylation dans la séquence exprimée. Il est plausible que l'écart entre la masse réelle et la masse attendue soit causée par l'occupation de ces sites par des N-glycannes. La bande de plus haute masse serait donc la protéine AtFuT1 potentiellement N-glycosylée. Par contre la présence d'une espèce moléculaire à 58 kDa reste inexpliquée, d'autant plus que sa masse est inférieure à la masse attendue de la protéine non glycosylée (59,7 kDa). Des tests de déglycosylation et un séquençage N-terminal ont donc été effectués pour comprendre la nature de ces deux espèces protéiques.

### ➤ Test de dé-glycosylation

Une glycosylation hétérogène peut induire des masses différentes pour une même protéine. Deux sites de glycosylation sont prédits sur la séquence primaire d'AtFuT1. Trois états de glycosylation sont possibles : aucun site, un site, ou deux sites occupés. L'expérience repose sur l'hypothèse (i) que des N-glycannes sont présents à la surface de la protéine, (ii) qu'ils peuvent être clivés par un endoglucanase et que (iii) la différence de masse induite est observable par migration sur SDS-PAGE, ou quantifiable par MALDI-TOF. La figure IV.10 illustre les types de N-glycannes retrouvés majoritairement sur les protéines produites en cellules d'insecte. Des tests de dé-

glycosylation ont été effectués avec la peptide N-glycosidase A (PNGase A, Sigma) qui possède la spécificité de cliver les N-glycannes présentant un fucose lié en  $\alpha 1,3$  sur le résidu GlcNAc proximal.

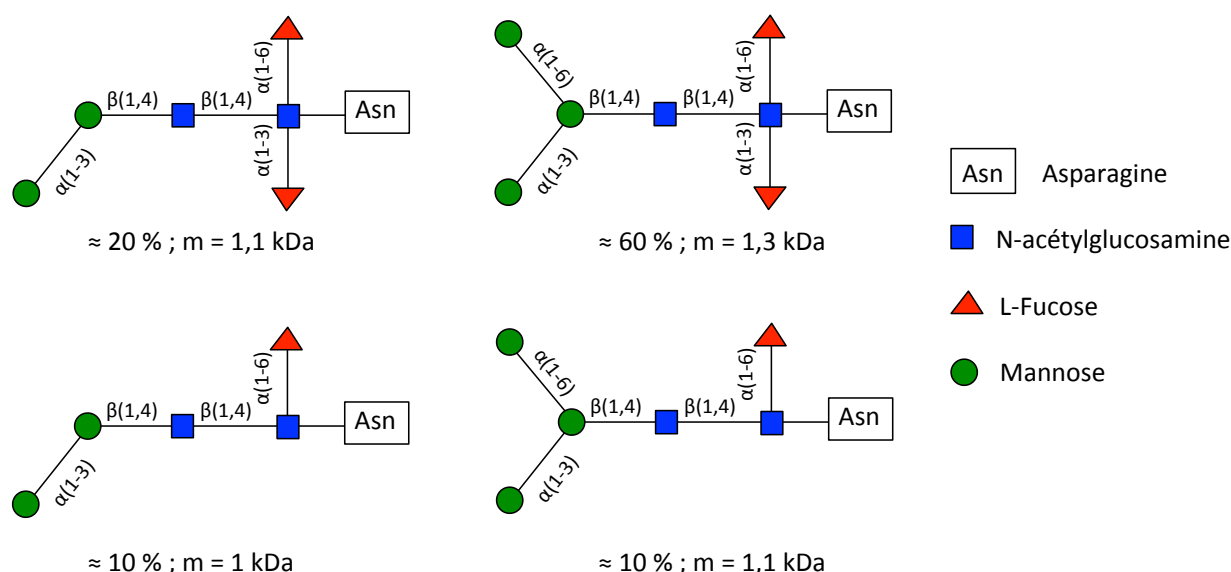
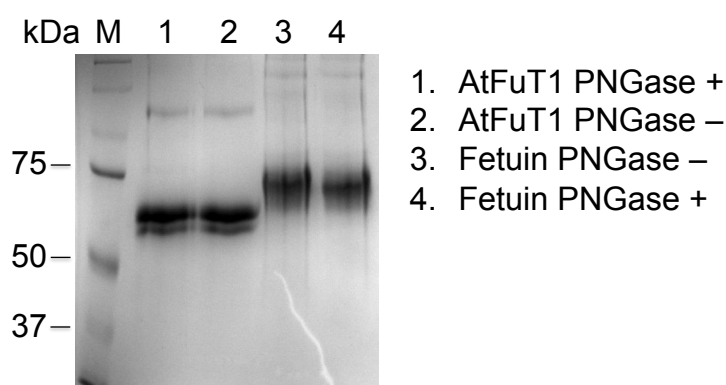


Figure IV.10 : Quatre N-glycannes majoritaires des cellules High-Five

Représentation de quatre N-glycannes majoritairement retrouvés sur les protéines N-glycosylées sécrétées à partir de cellules d'insectes *High-five*. D'après Ding 2003 et Dojima 2009.

La bande correspondant à la fétuine incubée en présence de la PNGase A semble migrer légèrement plus bas que celle sans endoglucanase (Figure IV.11). En revanche, aucun



effet n'a été observé sur AtFuT1.

Figure IV.11 : test de déglycosylation d'AtFuT1

Migration des échantillons en SDS-PAGE 12 % d'acrylamide. Les protéines AtFuT1 et fétuine ont été incubées pendant 15 h à 37°C avec 0,25 mU de PNGase A, dans 100  $\mu$ l.

Ce test a été répété deux fois dans des conditions proches avec un temps d'incubation plus long. Les résultats ont été similaires et n'ont pas permis de tirer une conclusion précise. En effet, s'il ne démontre pas la présence de N-glycannes, ce résultat n'en

démontre pas non plus l'absence. Il est possible que l'enzyme soit inactive ou que les conditions choisies ne lui aient pas permis d'agir efficacement : qu'AtFuT1 s'agrège à ce pH, que du SDS restant inhibe l'action de la PNGase, etc.

### ➤ Séquençage N-terminal

Pour résoudre le problème de la présence de la bande basse à 58 kDa, un séquençage de la partie « N-ter » des protéines de chacune des deux bandes distinctes sur gel a été entrepris. Cela permet de déterminer si une troncation en N-terminale de la protéine a pu avoir lieu. Le séquençage N-ter des protéines, ou séquençage d'Edman, (EDMAN, 1956) est un processus chimique, cyclique, durant lequel les acides aminés sont clivés un par un et traités pour être identifiés par chromatographie. Les protéines du gel sont transférées en fin de migration sur membrane PVDF et colorées au bleu de Coomassie. Les bandes d'intérêt sont alors découpées et analysées séparément. Cette expérience a été réalisée à la plateforme « séquençage et analyse des acides aminés » de l'Institut de Biologie Structurale de Grenoble. Deux chaînes peptidiques distinctes ont été identifiées (Figure IV.12).

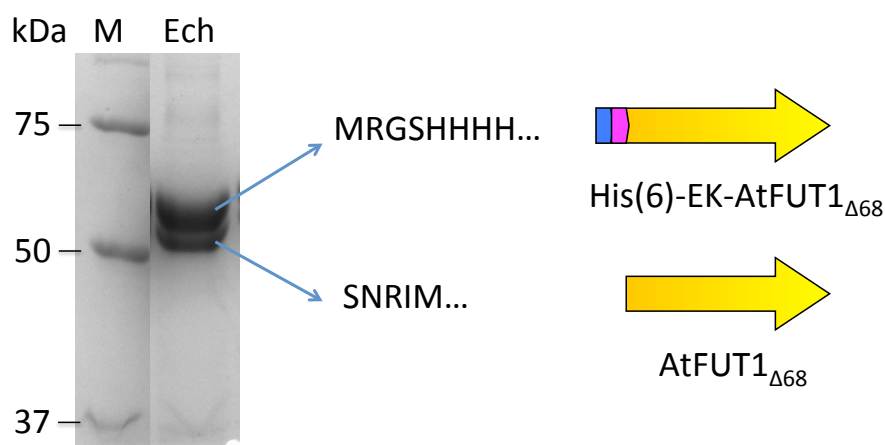


Figure IV.12 : Résultat du séquençage N-terminale des formes purifiées d'AtFuT1

Les acides aminés identifiés à partir de la bande haute (à 62,3 kDa) correspondent à la partie N-terminale de la construction exprimée. Ceux de la bande basse (58-59 kDa) sont les premiers acides aminés de la troncation. His(6) = étiquette poly histidine, EK = site de l'entérokinase et de reconnaissance par l'anticorps X-Press

La partie N-terminale des protéines issues de la bande haute (62 kDa) correspond au début de la construction His-EK- AtFuT1 $\Delta$ 68 et celle de la bande basse à un clivage de cette dernière. De manière surprenante, il s'agit des premiers acides aminés d'AtFuT1 au niveau de la troncation AtFuT1 $\Delta$ 68. Il y a donc bien deux formes distinctes de la même protéine dans l'échantillon purifié. La forme de la bande du bas ne comporte pas l'étiquette (His)<sub>6</sub>, par laquelle se fait la première purification. Cette observation conforte le fait qu'AtFuT1 est en dimère dans les conditions de l'expérience, car sinon cette forme n'aurait pas pu être retenue sur colonne HisTrap. Cela peut expliquer aussi le fait que la

proportion de chaque bande varie selon les conditions de culture, de purification, ainsi qu'en fonction du gradient d'imidazole.

## ➤ Bilan des analyses biochimiques

Il est certain que deux formes de la construction His-EK-AtFuT1<sub>Δ68</sub> se trouvent dans l'échantillon purifié, dont les masses sont de l'ordre de 58 kDa et 62 kDa. Chaque séquence possède les deux sites de glycosylation potentiels. Leurs masses prédites sur la base des séquences en acides aminés sont respectivement de 55,7 kDa et de 59,7 kDa (serveur *protein parameter*). Bien que les masses de N-glycannes puissent varier, schématiquement, six combinaisons sont possibles (Figure IV.13). La masse des N-glycannes utilisée pour ces estimations est de  $1,2 \pm 0,2$  kDa, ce qui correspond à plus de 80 % des structures rencontrées sur les protéines sécrétées à partir de cellules d'insecte High-five (Ding et al., 2003 ; Dojima et al., 2009).

Figure IV.13 : différentes formes possibles d'AtFuT1 dans les échantillons purifiés.

Les éléments pris en compte sont le clivage de l'étiquette du vecteur et la présence de N-glycannes sur les sites prédits. Pour l'hypothèse où un seul glycanne est présent, seule la possibilité de branchement sur le site N-ter est représentée par souci de simplification, mais la masse estimée du glycanne reste la même quelle que soit sa position. Un symbole coché est attribué si la masse de la structure peut correspondre à l'un des deux pics du spectre MALDI-TOF et une croix si celle-ci diffère de plus de 0,5 kDa de l'une des valeurs mesurées (58 - 59 ; 62 kDa).

| Forme possible                                                                       | Masse estimée (kDa) |   |
|--------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|---|
|    | 59,7                | ✗ |
|    | 60,9 ± 0,1          | ✗ |
|  | 62,1 ± 0,2          | ✓ |
|  | 55,7                | ✗ |
|  | 56,9 ± 0,1          | ✗ |
|  | 58,1 ± 0,2          | ✓ |

Les écarts de masses mesurés (3-4 kDa) correspondent davantage à un écart induit par le clivage de la partie N-ter de l'étiquette de la protéine (4 kDa). La masse de 62,3 kDa mesurée par MALDI-TOF correspond vraisemblablement à la forme entière de la construction avec deux glycannes ( $62,1 \pm 0,1$  kDa). Celle correspondant à 58 kDa à la forme tronquée avec deux N-glycannes.

## IV.4. Titration calorimétrique isotherme (ITC) d'AtFuT1

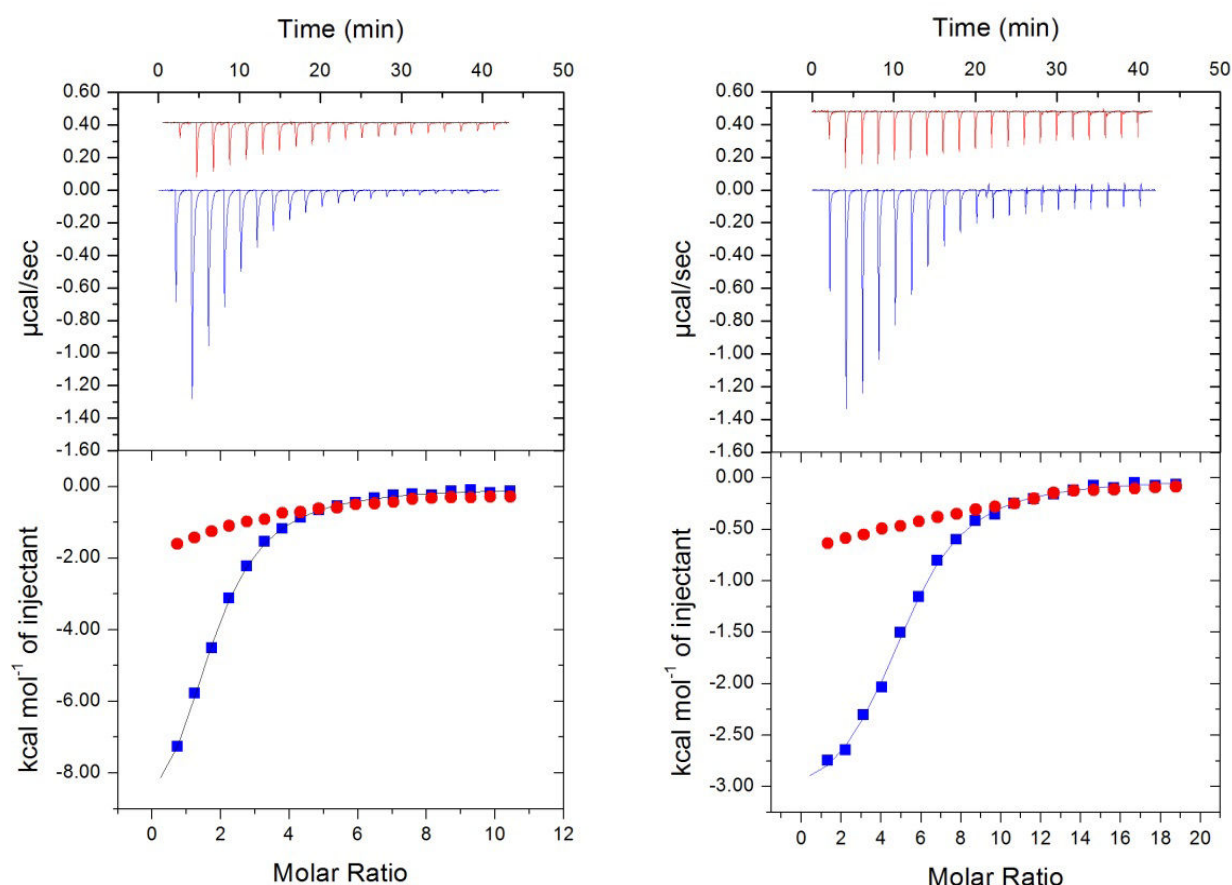
L'obtention de l'ordre du milligramme d'enzyme pure et active a permis de compléter les études d'affinité d'AtFuT1 pour ses substrats par la méthode de titration calorimétrique isotherme (ITC). Ces mesures ont été effectuées par Emilie Gillon, technicienne spécialiste des appareils ITC employés au laboratoire.

L'ITC permet de mesurer l'affinité et d'autres paramètres thermodynamiques lors de l'interaction de deux molécules. Le principe consiste à titrer un réactif (ligand) par rapport à un autre, en condition isotherme. Le signal mesuré correspond à la variation de chaleur absorbée ou dégagée par la liaison des composés. Une série d'injections du ligand sont effectuées et le signal s'approche de zéro au fur et à mesure que le composé limitant devient saturé. Les paramètres de l'interaction sont obtenus ensuite par le traitement des pics d'injections.

Le paramètre recherché par cette série d'expériences est l'affinité d'AtFuT1, par l'étude de sa constante de dissociation ( $K_d$ ), pour chacun de ses substrats. En particulier, l'affinité pour un substrat seul, ou en présence du deuxième. L'affinité de l'enzyme pour un oligosaccharide issu de la digestion de xyloglucane a aussi été recherchée. Il s'agit du fragment XLLGXLLG, comportant une chaîne principale de huit glucoses. L'objectif est alors d'identifier dans quelle mesure l'enzyme peut se lier à cet accepteur de plus petite taille.

Le polysaccharide xyloglucane (Xyg) et le xylooligosaccharide (Xygo) utilisés pour ces tests ont été purifiés au laboratoire à partir de graines de tamarin, conservés à sec puis re-suspendus dans le même tampon que l'enzyme. Du GDP a été utilisé à la place du GDP-fuc, pour éviter la réaction de transfert et ne mesurer que des activités de liaison. De plus, il est admis pour les GTs que la liaison du nucléotide-sucre au niveau du site actif de l'enzyme implique de façon prépondérante la partie nucléotidique. Par ailleurs, l'hydrolyse non-enzymatique du GDP-fucose, même si c'est un événement lent, peut aussi fausser les mesures d'interaction.

Aucune titration efficace de l'enzyme n'a pu être obtenue par l'ajout de l'un des deux ligands uniquement ([Figure IV.14](#)). Le GDP comme le xyloglucane induisent des courbes de titrations non sigmoïdes, du fait de la difficulté à revenir à la ligne de base. Les valeurs obtenues sont incohérentes et varient du simple au double d'une expérience à l'autre. À l'inverse, lorsque l'enzyme est placée dans la cuve en présence de l'un des ligands, la titration par le deuxième ligand fournit des données de bonne qualité et des valeurs reproductibles.



| Titration : | cellule    | seringue |
|-------------|------------|----------|
| Rouge       | AtFut1     | GDP      |
| Bleu        | AtFut1+GDP | XG       |

| Titration : | cellule   | seringue |
|-------------|-----------|----------|
| Rouge       | AtFut1    | XG       |
| Bleu        | AtFut1+XG | GDP      |

Figure IV.14 : titration calorimétrique isotherme d'AtFuT1

La titration a été effectuée par du xyloglucane ou du GDP, seul (courbe rouge) ou en présence de l'autre substrat (courbe bleu).

AtFuT1 a été titrée une première fois par du GDP seul (Figure IV.14 gauche, courbe rouge), puis une seconde fois par du xyloglucane en présence donc de GDP (figure IV.14, courbe bleue). La réaction inverse a été aussi réalisée : 1ere titration par le Xyg et seconde titration par le GDP (figure IV.14 droite). Les deux mesures ont été dupliquées et ont abouti aux mêmes constantes de dissociation ( $K_d$ ): 13  $\mu$ M et 15  $\mu$ M pour le xyloglucane et le GDP, respectivement. AtFuT1 semble donc nécessiter ses deux co-substrats pour se lier efficacement à l'un comme à l'autre, traduisant un effet coopératif de ces derniers. Lorsque le polymère de xyloglucane a été remplacé par l'oligosaccharide de séquence XLLGXLLG, la valeur du  $K_d$  mesurée a été de  $64 \pm 4$   $\mu$ M (mesure effectuée en duplicat). L'affinité relative de l'enzyme apparaît donc quatre fois plus faible pour le xylooligosaccharide que pour le polysaccharide. Nous avons vu précédemment que l'enzyme avait besoin d'accepteurs de taille suffisamment importante pour effectuer un

transfert de fucose (l'enzyme ne semble pas active sur des motifs courts de type XLLG). Ces résultats d'ITC renforcent l'idée qu'une taille minimale d'accepteur est nécessaire pour que la réaction de transfert s'opère efficacement.

---

## **Chapitre V : Recherche de nouveaux tests de criblage d'activité GTs**

---



## V. Recherche de nouveaux tests de criblage d'activité GT

L'une des activités de l'équipe glycobiologie moléculaire du CERMAV est d'identifier de nouvelles activités glycosyltransférases. Les efforts s'orientent particulièrement sur les GT impliquées dans la synthèse de polysaccharides de la paroi végétale, puisque peu d'entre elles ont une activité biochimique précisément caractérisée. La difficulté principale étant de déterminer quels sont les deux co-substrats (nucléotide-sucre et accepteur) d'une enzyme donnée, pour démontrer une activité transférase. Les polysaccharides de la paroi sont très divers, et les structures d'accepteurs sont d'autant plus variées que chaque enzyme intervient à une étape précise de la synthèse d'un polymère. Il est donc nécessaire de disposer d'un test permettant de cribler facilement des interactions ou des réactions d'une enzyme donnée, avec une variété de nucléotide-sucres et une banque de structures d'accepteurs candidats. Jusqu'alors, le test utilisé au laboratoire est basé sur un transfert de sucre radioactif sur un accepteur (Figure II.4). Ce test est très sensible et robuste même s'il ne se prête guère à du criblage moyen ou haut débit. Par ailleurs, certains nucléotides-sucres ne sont pas disponibles commercialement sous forme radioactive. L'équipe cherche donc à développer de nouvelles approches permettant de cribler efficacement des interactions enzyme-substrats. Les techniques envisagées durant ce doctorat ont été : (i) une méthode de dosage du phosphate facile à mettre en œuvre et peu coûteuse, (ii) la détection d'interaction par résonance plasmonique de surface, et (iii) le test commercial basé sur la bioluminescence commercialisé par Promega et décrit dans le chapitre IV. L'enzyme purifiée AtFuT1 $\Delta$ 68 a permis de tester ces différentes méthodes.

### V.1. Criblage par dosage du phosphate

L'objectif de ce test est de pouvoir cribler facilement un grand nombre de conditions à moindre coût. Le but n'est pas de nécessairement de quantifier, mais de détecter une activité de transfert. Le principe consiste à mesurer, par un test colorimétrique, le phosphate issu de deux activités enzymatiques au sein d'un échantillon (Figure V.1). Une phosphatase alcaline est présente dans le milieu réactionnel contenant la glycosyltransférase et ses substrats. Si la GT clive le nucléotide-diphosphate-sucre (NDP-sucre) pour transférer le glucide sur un accepteur alors le NDP, produit de la réaction, devient le substrat de la phosphatase. Selon le type de phosphatase, un ou les deux phosphates du NDP sont clivés. C'est ce phosphate produit qui est alors dosé chimiquement, par un réactif approprié. Un test fondé sur ce principe est commercialisé par l'entreprise « US Biological Life Sciences» sous le nom de « Glycosyltransferase

Activity BioAssay Kit ». Ce dernier repose sur la complexation des ions phosphate avec le molybdate d'ammonium qui, associé au vert de malachite, donne un complexe coloré. La nucléotidase ENTPD3/CD39L3 employée clive un seul phosphate du NDP. Ce kit est vendu environ 540 € (actualisation du prix en septembre 2015) pour une quantité de réactifs correspondant à 200 réactions. Le coût de ce test semble principalement induit par la phosphatase utilisée : ENTPD3/CD39L3, qui coûte environ 300 € / 20 µg lorsque commandée séparément.

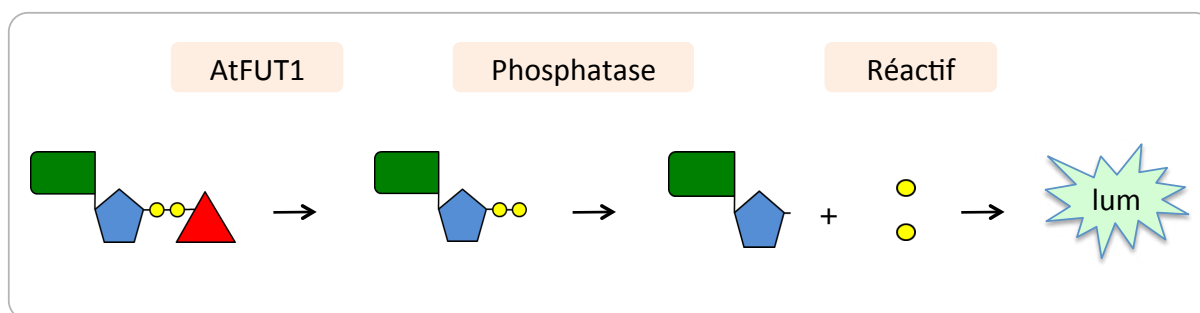


Figure V.1 : Principe du dosage d'activité GT par mesure du phosphate

Exemple avec AtFuT1 et du GDP-fuc (l'accepteur a été omis). Différentes phosphatases peuvent être utilisées. La 5' nucléotidase ENTPD3/CD39L3 clive un seul phosphate alors que la phosphatase alcaline de sérum bovin en libère deux. Le dosage de cet élément se fait par un complexe malachite/molybdate d'ammonium

Le dosage de phosphate par un complexe molybdate d'ammonium/malachite est une technique ancienne (Baykov, Evtushenko, & Avaeva, 1988 ; Geladopoulos, Sotiroidis, & Evangelopoulos, 1991 ; Wu et al., 2011). Par ailleurs, des phosphatases alcalines issues d'intestin de veau (non spécifiques) sont présentes dans tous les congélateurs des laboratoires de biologie moléculaire. Un test basé sur le même principe que le kit commercial a donc été reproduit au laboratoire, avec les composés disponibles au sein de l'équipe. Le format adopté est la plaque de 96 puits, de manière à effectuer de nombreux tests en parallèle.

### ➤ Conditions de l'expérience

Parmi les nombreux articles faisant référence à l'utilisation de malachite pour le dosage de phosphate, le protocole le plus clair identifié est celui mis au point par Baykov et al., en 1988. « Dans un premier temps, une solution de coloration est réalisée : 0,44 g de vert de malachite sont ajoutés à de l'acide sulfurique préalablement dilué au sixième dans 360 ml d'eau ». La solution de malachite de couleur orange/brune, peut être gardée plusieurs mois à température ambiante ; mieux vaut en réaliser dix fois moins. « Le jour de l'utilisation, 2,5 ml de molybdate d'ammonium 7,5 % sont ajoutés à 10 ml de la solution de malachite, puis 0,2 ml de Tween<sub>20</sub> à 11 % ». Ceci forme le réactif de dosage du Pi. « Un volume de ce réactif est ajouté à quatre volumes de la solution à analyser » soit 25 µl pour 100 µl, et le tout est incubé 10 mn. L'absorbance du produit coloré formé

est ensuite mesurée à une longueur d'onde de 630 nm. Le vert de malachite commercialisé peut être soit sous forme d'oxalate ou de sulfate de malachite. Les articles utilisés pour mettre au point ce protocole ne précisent pas lequel ils utilisent. Le kit commercialisé par « US Biological Life Sciences » emploie le vert de malachite oxalate. Les deux formes ont été testées au laboratoire. La solution réactive à base de vert de malachite oxalate semble plus sensible qu'avec le sulfate de malachite. Dans les deux cas, l'allure de la droite d'étalonnage et l'amplitude de la réponse linéaire sont similaires : environ 5 à 150  $\mu\text{M}$  (Figure V.2).

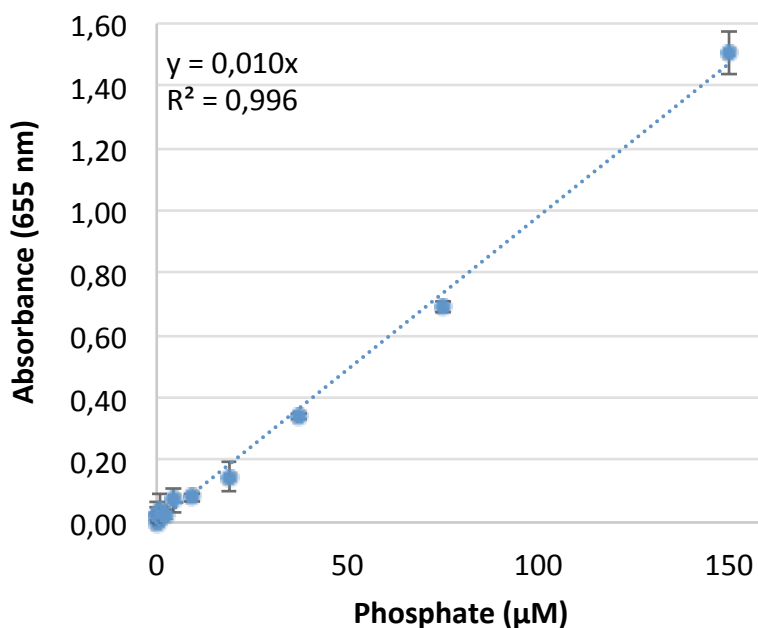


Figure V.2 : comparaison des courbes d'étalonnage de deux solutions réactives à base de malachite.

Étalonnage réalisé avec une solution réactive à base de malachite sulfate. La réponse est linéaire entre 5 et 150  $\mu\text{M}$ .

Le seuil de détection et l'amplitude de la gamme de la solution réactive (figure V.2) est très comparable aux valeurs présentées par les kits commerciaux (1-70  $\mu\text{M}$ ). Cette méthode permet de travailler avec des quantités raisonnables de substrats et d'enzyme : par exemple : 5-100  $\mu\text{M}$  de nucléotide sucre avec 1-10  $\mu\text{g/ml}$  d'enzyme par puits.

Les conditions du test doivent permettre d'utiliser suffisamment peu de réactifs afin de cribler un grand nombre de conditions. L'objectif n'est pas de travailler à saturation de l'enzyme mais de pouvoir détecter un transfert, et donc un signal suffisant, y compris si la concentration d'accepteurs (difficiles à obtenir) est faible. La phosphatase utilisée doit ensuite pouvoir cliver tout le phosphate à partir des NDP produits, de manière à ne pas diminuer le signal. Cette enzyme est toutefois diluée de manière importante, afin que les composés de son tampon n'interfèrent pas avec la réaction GT. Plusieurs gammes d'étalonnages ont été effectuées avec différentes concentrations de phosphatase, dans le tampon de la protéine AtFuT1 (Figure V.3).

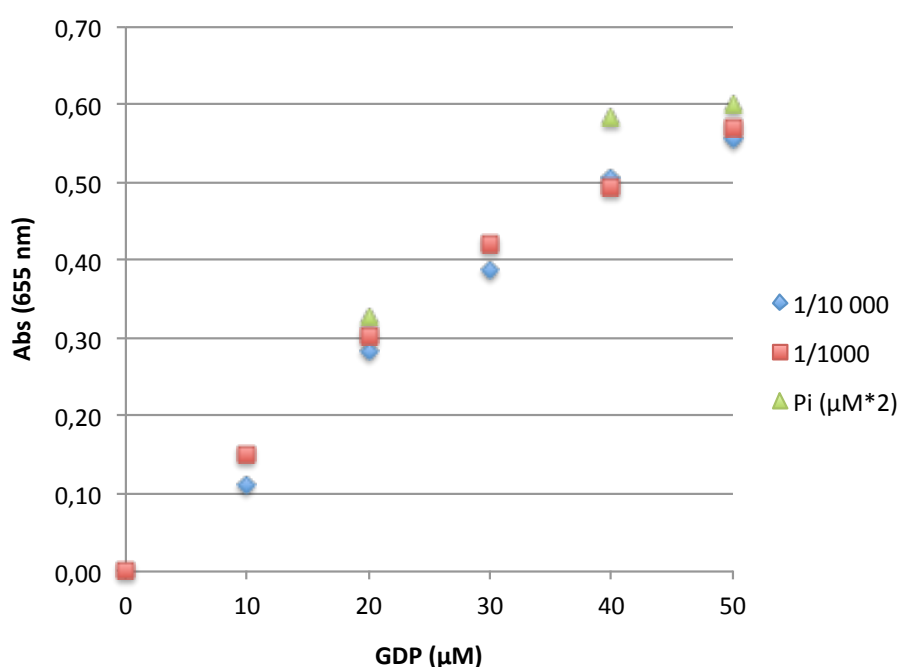


Figure V.3 : Gammes étalons de GDP avec différentes dilutions de phosphatase

La solution stock de phosphatase (*Calf intestinal phosphatase*, NEB) est à 10,000 unités/ml. Tampon HEPES 25 mM ; NaCl 150 mM, pH 7,4. Les trois contrôles de phosphates sont aux concentrations de 40 ; 80 et 100 μM. Solution réactive à base de malachite oxalate.

L'utilisation de l'enzyme à 1/1000 ou 1/10 000 final n'induit pas de différence importante du signal de phosphate libéré, qui correspond approximativement au double de la concentration de GDP. Les tests de mise au point ont été réalisés avec 50 μM de GDP-fucose et 5 mg/ml de xyloglucane. Les concentrations en réactifs utilisées pour les expériences suivantes, sauf précisions indiquées, sont celles du Tableau V.1. La réaction de GT est effectuée pendant 20 mn à température ambiante, puis est stoppée par l'ajout du réactif.

**Tableau V.1 : Test de dosage à la malachite, concentration des réactifs**

| <b>réactif</b>     | <b>Concentration</b> |
|--------------------|----------------------|
| GDP-fuc            | 50 $\mu$ M           |
| Polysaccharide     | 2 mg/ml              |
| Phosphatase (NEB)  | 1/10000              |
| AtFuT1 $\Delta$ 68 | 0,4 $\mu$ g/ml       |

### ➤ **Caractérisation d'une activité de transfert**

Des tests d'activité de transfert de fucose ont été réalisés avec différents polysaccharides purifiés au laboratoire, dont du xyloglucane de graines de tamarin (Figure V.4). Seule la présence d'AtFuT1 avec du xyloglucane permet d'observer une absorbance significativement plus importante qu'avec les autres polysaccharides. Cependant, cette valeur est à peine deux fois supérieure aux autres conditions avec un accepteur non approprié.

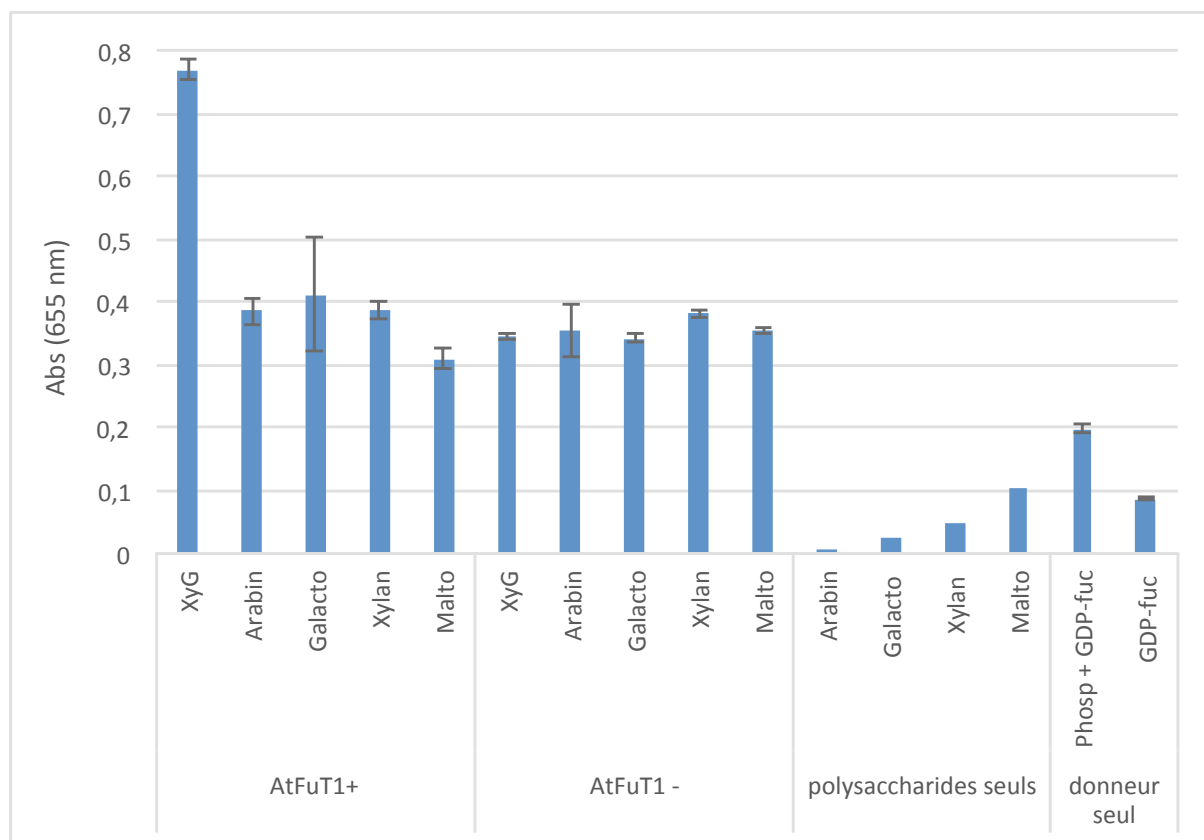


Figure V.4 : Test de détection d'activité FucT en présence de différents accepteurs.

AtFuT1+ = présence d'AtFuT1, du donneur, de l'accepteur et de la phosphatase. AtFuT1- = conditions identiques sans AtFuT1. XyG = xyloglucane, Arabin = Arabinane, Galacto = Galactane, Malto = maltodextrine. Dans les conditions « polysaccharides seuls », les polymères sont en présence de tampon uniquement. Les deux conditions « donneurs seuls » correspondent au GDP-fuc avec la phosphatase et au GDP-fuc en présence de tampon uniquement. Les réactifs sont toujours utilisés aux mêmes concentrations. L'absence d'un composé est compensée par du tampon, pour atteindre le volume de 100  $\mu$ l. Tests réalisés avec le GDP-fucose de Sigma. Solution réactive à base de malachite oxalate.

Ces autres conditions comportent un polysaccharide qui n'est pas le substrat de l'enzyme, la phosphatase, du GDP-Fuc et AtFuT1. Un contrôle sans AtFuT1, incluant du xyloglucane, est aussi effectué. Les valeurs élevées des contrôles peuvent être expliquées pour moitié par la contamination de la source de GDP-fuc. **Le GDP-fuc utilisé pour cette expérience (Sigma) induit, en présence de phosphatase, un bruit de fond important : plus de 20 % de la valeur correspondant à la réaction positive.** Des mesures de chromatographie par HPLC ont permis de montrer que ce dernier est contaminé par 15 à 20 % de GDP (non montré). Du phosphate est aussi probablement présent dans cette source de GDP-fuc puisqu'un signal d'environ 0,08 est mesuré sans phosphatase. Les polysaccharides contrôles, préparés en eau distillée, induisent un faible bruit de fond, mis à part le maltodextrine. Les mesures de ces polymères seuls, ajouté au tampon de la protéine n'ont pas été dupliquées. Le maltodextrine s'est difficilement solubilisé, ce qui peut expliquer une absorbance importante. Le niveau

élevé des valeurs correspondant aux contrôles négatifs réduit de manière importante l'amplitude de la gamme au sein de laquelle peuvent se faire des mesures d'activités.

La source de GDP-fucose a donc été changée. Celui désormais utilisé (Promega) induit un bruit de fond quasiment inexistant (figure V.5, contrôles n°3 et 5). Dans le but de comprendre quels réactifs, ou quelle combinaison de réactifs induit un signal important en l'absence d'enzyme, une série de contrôles a été effectuée. La présence de GDP (50  $\mu$ M, Promega) avec phosphatase permet de connaître la valeur à atteindre si l'enzyme AtFuT1 utilise la majorité du GDP-fucose (50  $\mu$ M).

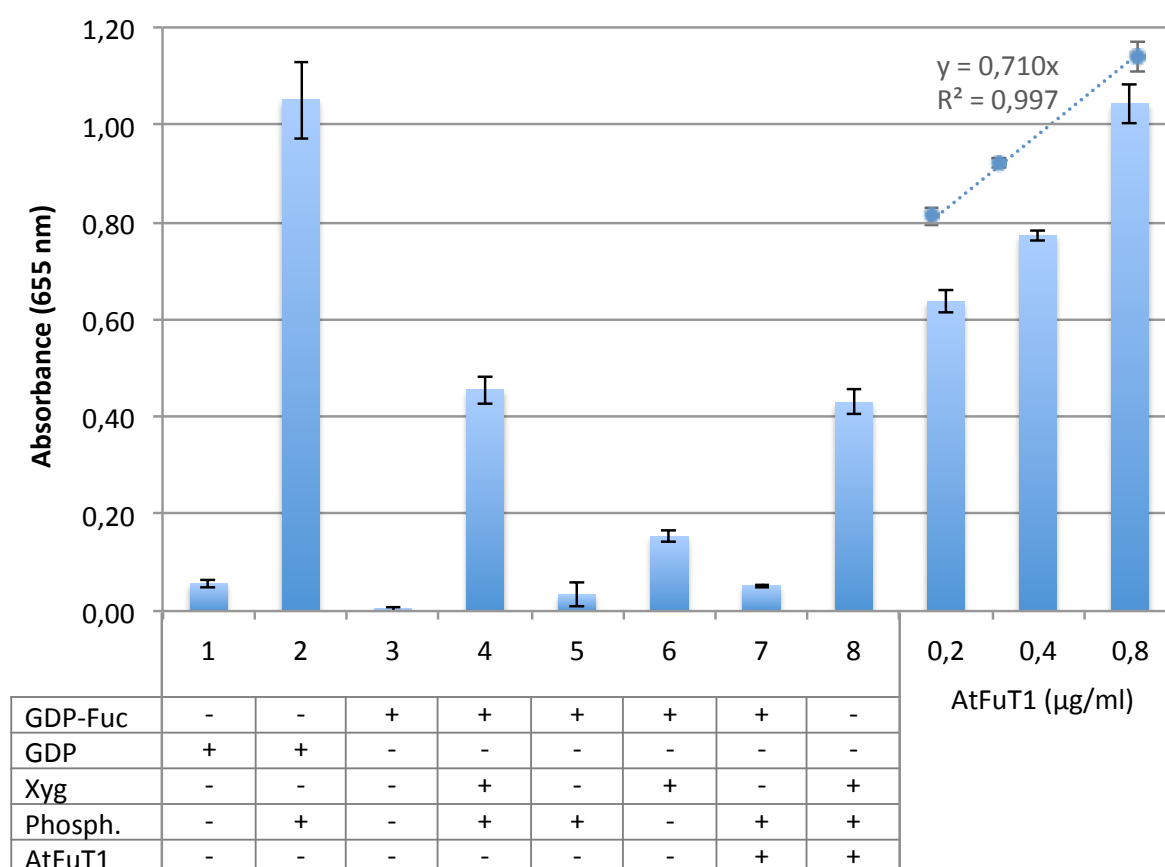


Figure V.5 : Contrôle des réactifs et mesure d'activité d'AtFuT1 avec le test de détection à la malachite.

Chaque combinaison de réactifs est présentée sous le numéro. L'absence d'un composé est compensée par le volume équivalent en tampon de la protéine. Les concentrations utilisées pour les contrôles sont celles décrites dans le Tableau V.1. Tests réalisés avec du GDP-fucose de Promega. Solution réactive à base de malachite sulfate.

En présence de la phosphatase, avec et sans AtFuT1, aucune hydrolyse significative du GDP-fuc n'apparaît (contrôles n° 5 et 7). Le GDP-fuc en présence de xyloglucane induit un signal plus élevé, indiquant une présence probable de phosphore dans la solution de xyloglucane (n° 6). Il est par contre étonnant d'observer qu'en présence de trois réactifs : GDP-fuc + xyloglucane + phosphatase (n° 4) ou xyloglucane + phosphatase + AtFuT1 (n° 8) le signal est à nouveau élevé. La phosphatase alcaline bovine étant très peu

spécifique, il est possible qu'elle clive le phosphate de quelque molécule co-purifiée lors de la préparation de xyloglucane. Dans les conditions de ce test avec le xyloglucane, La gamme d'absorbance effective pour une mesure d'activité AtFuT1 est comprise environ entre 0,4 et environ 1,4 (Gamme étalon [figure V.5](#)). Au sein de cette zone, le signal obtenu en fonction de la concentration de GT est très linéaire. Cela est donc suffisant pour détecter une activité GT, comparer quelques accepteurs ou lots d'enzymes, mais peut difficilement servir à faire des séries de mesures pour déterminer des paramètres enzymatiques. A condition d'inclure les contrôles nécessaires, c'est à dire vérifier notamment la qualité des préparations d'accepteurs, ce test est facile d'emploi et parfaitement adaptable pour du criblage « qualitatif ». Identifier la contamination « phosphate » associée au xyloglucane pourra permettre d'améliorer la sensibilité du test et/ou la préparation des accepteurs. L'utilisation d'une phosphatase plus spécifique des nucléotides (ex : ENTPD3/CD39L3) est à envisager également.

## V.2. Détection d'interactions glycosyltransférase - accepteur par SPRi

### ➤ Une biopuce à oligosaccharides pariétaux

Dans le cadre d'un projet ANR (Wallarray) auquel a participé notre équipe, une biopuce à oligosaccharides issus de paroi végétale a été développée. Initialement, cette puce était dédiée à l'analyse de la spécificité de protéines pariétales. Ce projet a impliqué plusieurs partenaires publics de Toulouse, Grenoble et Nantes ainsi que la société Genoptics. La technologie SPR utilisée a été mise au point au CEA de Grenoble dans l'équipe de Thierry Livache (INAC/SPRAM). Nous avons saisi cette opportunité de tester cette technologie pour la détection d'accepteurs de GTs impliqués dans la biosynthèse de polysaccharides pariétaux. Ces expériences ont été menées dans le laboratoire de T. Livache.

Les oligosaccharides ont été obtenus à partir de polysaccharides pariétaux d'*A. thaliana* digérés par différentes enzymes, puis isolés par purification (Pedersen et al., 2012). Leur fixation sur les biopuces a impliqué différentes étapes de dérivatisation et couplage à du NHS-pyrrole (Mallevre et al., 2013). La fonctionnalité de ces puces a été vérifiée par les concepteurs de la méthode à l'aide d'anticorps reconnaissant des épitopes de polysaccharides pariétaux. Les biopuces conçues contiennent tous les motifs de xyloglucane présents dans les parties aériennes d'*Arabidopsis*, parmi lesquels deux sont des substrats de l'enzyme AtFuT1 in planta. Il s'agit des fragments XLLG et XXLG. Des tests d'activité d'AtFuT1 ont été réalisés avec des oligosaccharides de cette taille et aucune activité significative de transfert n'a été détectée. Cependant, une interaction de liaison avec une constante de dissociation de 64  $\mu$ M a pu être mesurée par ITC, pour le fragment XLLGXLLG. Puisque AtFuT1 reconnaît des fragments de xyloglucane en

solution, il a semblé intéressant de voir si elle pouvait reconnaître des xylooligosaccharides fixés sur la biopuce. Dans le cas où l'hypothèse se vérifiait, la méthode pourrait alors être utilisée pour identifier des accepteurs d'autres glycosyltransférases potentiellement impliquées dans la biosynthèse de polysaccharides pariétaux.

### ➤ Imagerie de résonance des plasmons de surface (SPR)

La SPR « Surface Plasmon Resonance » ou « résonance de plasmons de surface » permet de suivre l'interaction de macromolécules avec des ligands fixés à la surface d'une fine couche de métal (Une description de la technique figure dans le chapitre [Matériels et Méthodes](#)). Le paramètre mesuré est une variation de réflectivité au cours du temps, provoquée par un changement d'indice du milieu à l'interface métal-ligand.

En SPR à imagerie, plusieurs dizaines ou centaines de « plots » de ligands différents sont disposés de manière spatialement définie à la surface de la plaque. L'interaction du composé à analyser vis à vis de chacun de ces plots est suivie en parallèle. Cela permet de cribler un grand nombre d'interactions, avec une sensibilité très importante, intrinsèque à la technique de SPR.

### ➤ Condition des expériences

Les biopuces ont été fonctionnalisées selon le plan de dépôt présenté en [figure V.6](#). Chaque oligosaccharide a été utilisé à une concentration simple et double pour les étapes de dérivatisation, couplage et fixation. Cela permet d'observer un éventuel effet de la concentration des sondes sur le pourcentage de réflectivité.

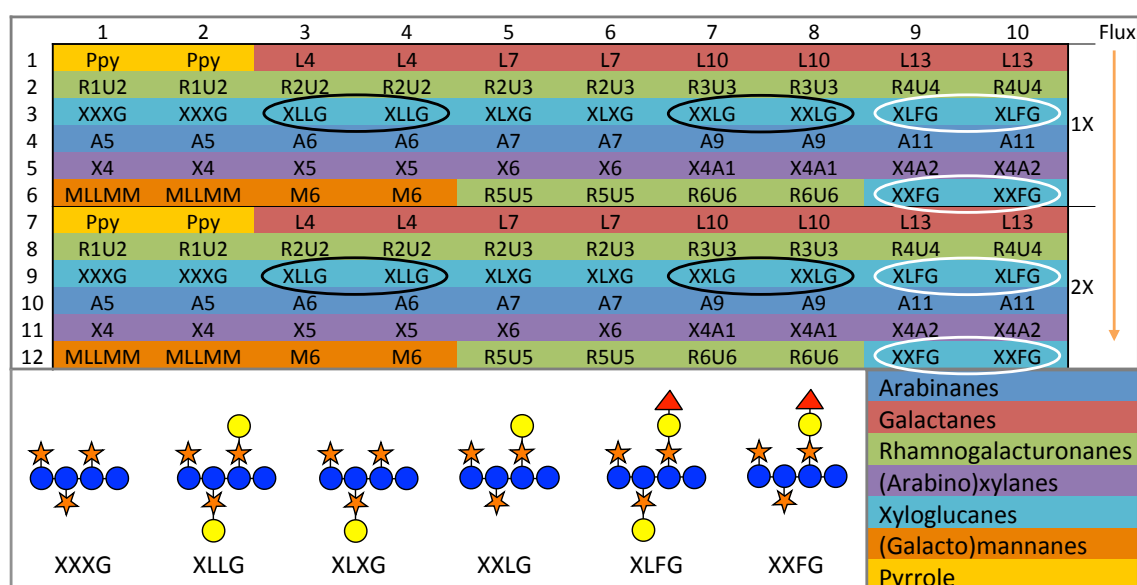


Figure V.6 : Plan de disposition de plots d'oligosaccharides.

Les fragments de xyloglucane sont mentionnés par la notation de Fry (Figure I.17). Parmi eux, ceux potentiellement reconnaissables par AtFuT1 sont cerclés en noir. Ceux comportant un fucose lié à un galactose, reconnu par la lectine UEA1 sont cerclés en blanc. L'anticorps contrôle LM5 reconnaît les tétrasaccharides de  $\beta(1,4)$ -D-galactanes : cellules rouge sur le plan.

Le tampon de course utilisé pour les expériences est à peu près identique à celui du tampon de la protéine AtFuT1, hormis qu'il contient entre 0,001 % et 0,01 % de Tween<sub>20</sub>. L'utilisation de ce détergent a pour but de limiter les interactions non spécifiques entre les protéines à analyser et la surface d'interaction. Des essais ont été effectués avec et sans saturation de la plaque avec la sérum albumine bovine (SAB). Les contrôles positifs employés sont (i) l'anticorps LM5 (Plant probes), spécifique des tétrasaccharides de  $\beta(1,4)$ -D-galactanes et (ii) la lectine UEA1 (*Ulex europaeus* agglutinin I) (Sigma-Aldrich) spécifique des fucoses liés en  $\alpha 1,2$ . La lectine UEA1 est utilisée classiquement dans cette équipe pour contrôler d'autres biopuces fonctionnalisées par des di-tri saccharides. Les concentrations à utiliser ont été déterminées avec le laboratoire partenaire, à partir d'expériences précédentes et d'utilisation avec d'autres biopuces. Le débit et le volume de tampon employés pour l'injection sont classiques pour ce type d'expériences et varient assez peu. Le débit a parfois été augmenté pour favoriser la dissociation des molécules. Le tampon le plus fréquemment employé pour régénérer la puce entre deux injections est la guanidine, à une concentration de 2 M. Cependant, seul le SDS à 1 % a permis de revenir à la ligne de base suite aux injections d'AtFuT1. La protéine AtFuT1 utilisée provenait de stocks à 7 mg/ml (150  $\mu$ M) stockés à 4°C pendant moins d'une semaine. Des injections d'AtFuT1 à plusieurs concentrations ont été effectuées.

**Tableau V.2 : conditions employées lors des tests d'interactions sur les biopuces à oligosaccharides**

| Paramètre                   | Valeur                                            | Variations testées      |
|-----------------------------|---------------------------------------------------|-------------------------|
| Tampon de course            | NaCl 150 mM ; Hepes 10 mM ; tween 0,001 %, pH 7,4 | 0,001 ; 0,1 % tween     |
| Débit ( $\mu$ /s)           | 0,5                                               | 0,5 ; 0,8               |
| Préparation de la puce      | BSA 1 %                                           | Aucun écrantage         |
| Concentrations AtFuT1 (nM)  | 200                                               | 20 ; 200 ; 500 ; 800 nM |
| Volume injection ( $\mu$ l) | 800                                               | -                       |
| Tampon de régénération      | SDS 1 %                                           | 2 M Guanidine           |
| Anticorps LM5               | 1/50                                              | 1/20 ; 1/50 ; 1/500     |
| Lectine UEA1 (nM)           | 300                                               | 500 ; 750 ; 1500        |

## ➤ Résultats des injections

L'anticorps contrôle LM5 induit une réponse spécifique des plots contenant des galactanes (Figure V.7).

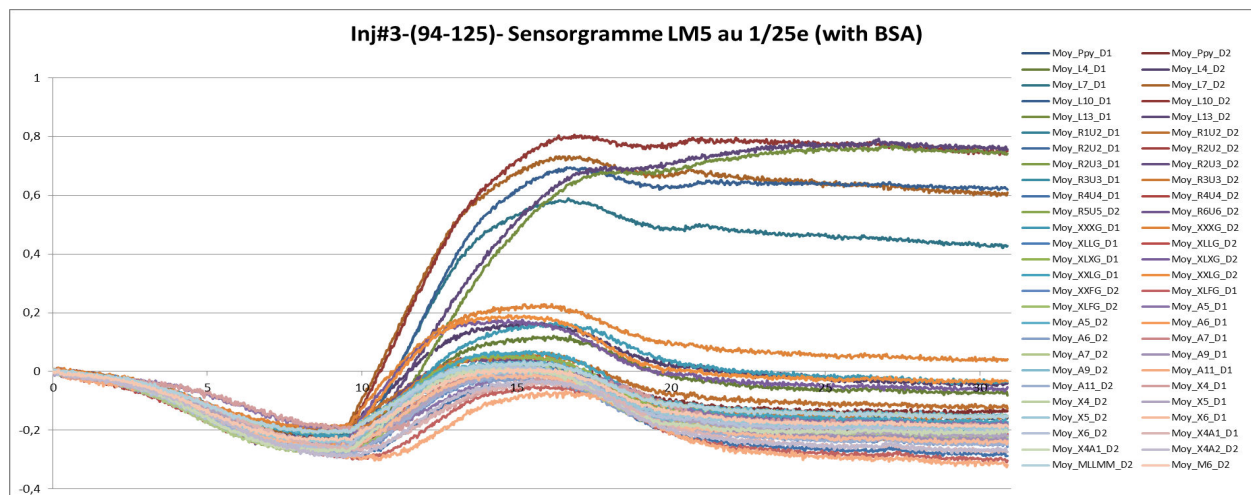


Figure V.7 : Sensorgramme correspondant au passage de l'anticorps contrôle LM5.

Les six courbes pour lesquelles la réflectivité varie de 0,5-0,8 % correspondent aux plots de 7, 10 et 13 unités de  $\beta(1;4)$ -D-galactanes. Les courbes en orange correspondent au tétramère.

Aux conditions de cette expérience, ainsi qu'à une dilution de 1/10, l'anticorps LM 5 reconnaît très bien les galactanes composés de 7 unités et plus, mais le signal est faible avec les plots de tétramères. Le tétramère de  $\beta(1,4)$ -D-galactanes est pourtant l'épitope cible de cet anticorps, selon le fournisseur.

En revanche, la lectine UEA1 n'induit aucune réponse spécifique des plots d'oligosaccharides contenant du fucose en liaison  $\alpha$ -1,2 (Figure V.8).

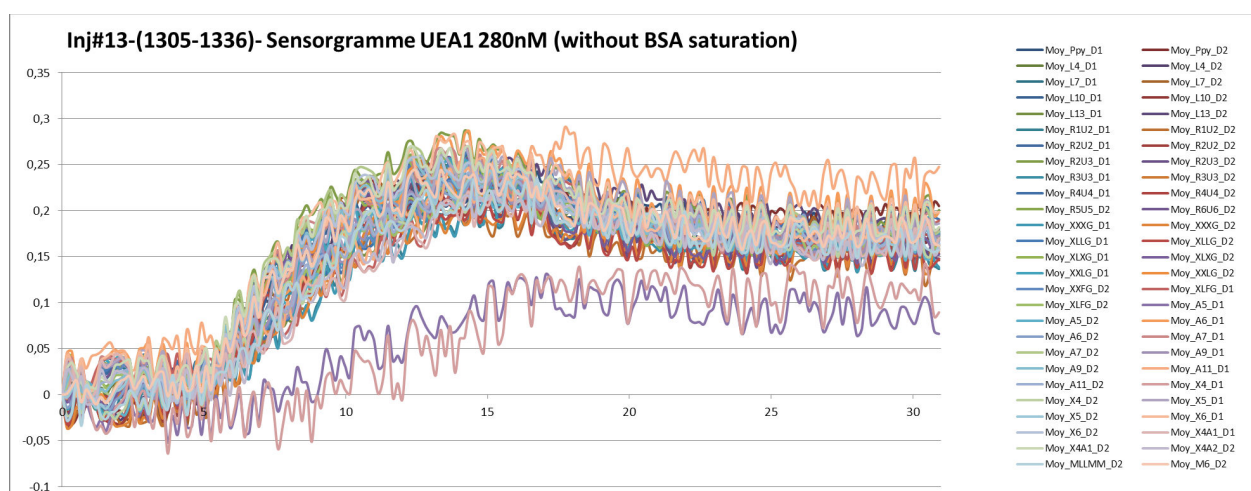


Figure V.8 : Sensorgramme correspondant à l'ajout de 280 nM de lectine UEA1 spécifique du fucose.

La réflectivité correspondant aux plots XLFG et XXFG ne varie pas de manière significativement différente des autres. Cette lectine est utilisée à 300 nM avec des plaques fonctionnalisées par des di-tri saccharides. Elle induit alors une différence de 4 – 5 % de réflectivité sur les plots contenant du fucose.

Aucune interaction spécifique n'a été observée avec AtFuT1 (Figure V.9). Des essais ont été effectués à différentes concentrations d'enzyme (voir Tableau V.2), avec ou sans saturation préalable à la BSA, en absence et en présence de GDP et de chlorure de manganèse.

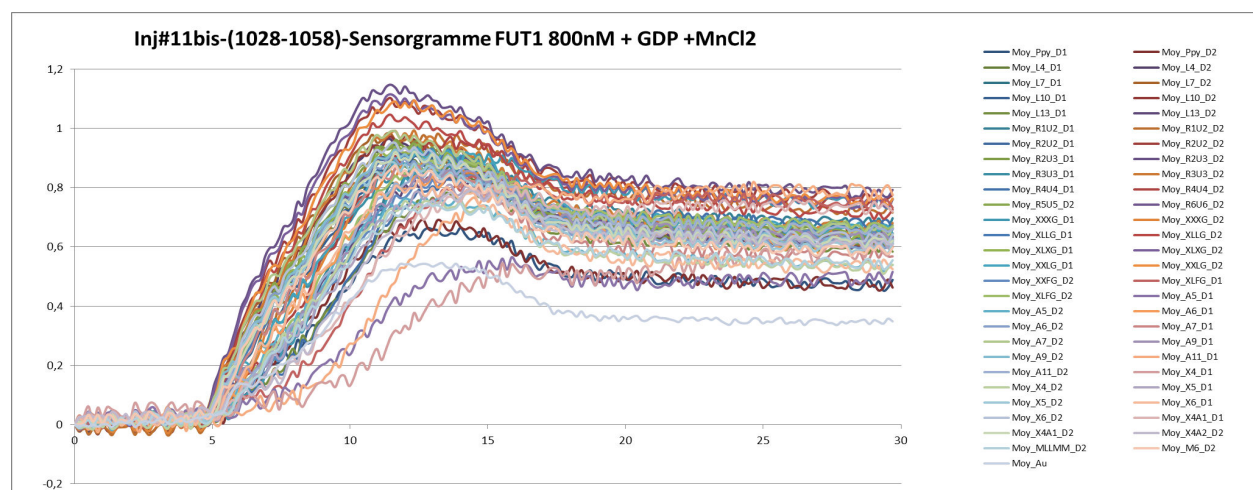


Figure V.9 : sensorgramme correspondant à l'injection de 800 nM d'AtFuT1

Cette injection est réalisée en présence de 8 µM de GDP et 8 µM de MnCl2

Les différentes conditions testées n'ont pas permis de détecter une variation de réflectivité spécifique pour les oligosaccharides de xyloglucane XXLG ou XLLG. Par ailleurs, l'étape de régénération n'a jamais pu être effectuée avec de la guanidine 2 M. Du SDS 1 % a été employé et la ligne de base a toujours été difficile à obtenir. Il semble que la protéine ne se fixe pas spécifiquement au substrat prédit, mais qu'elle adhère uniformément sur la plaque.

En conclusion, nous avons été confrontés dans cette technique à un bruit de fond très important et à une affinité certainement trop faible de l'enzyme pour des motifs oligosaccharidiques courts. Il est aussi possible que l'accessibilité de ces fragments soit aussi une limitation pour AtFuT1. Les résultats médiocres obtenus avec la lectine UEA1 confortent cette hypothèse. Dans son format actuel, ce type de biopuces ne semble donc pas adapté à la mesure d'interactions d'AtFuT1 avec son accepteur. Cette technologie reste cependant très attractive d'un point de vue conceptuel, mais des améliorations seront nécessaires, notamment l'utilisation d'oligosaccharides plus longs.

## V.3. Bioluminescence

Ce type de dosage d'activité GT basé sur la bioluminescence a été décrit dans le chapitre IV. Il s'agit d'un kit commercial vendu par Promega. Nous avons été l'un des premiers clients à utiliser la version « GDP-Glo » destinée aux GTs utilisant un GDP-sucre. Il s'agit d'une méthode très sensible, facile à mettre en œuvre, qui nous a permis de déterminer les paramètres cinétiques d'AtFuT1. Son utilisation en microplaques avec lecture par un luminomètre et son rapport signal/bruit de fond la rend tout à fait adéquate pour du criblage à moyen et haut débit. Ce système peut avantageusement remplacer le test radioactif en place au laboratoire pour doser l'activité de GTs. Ce dernier présente cependant l'avantage de pouvoir être réalisé à partir d'extraits non purifiés d'enzymes produites en système cellules d'insectes. Un essai préliminaire a montré que le kit GDP-Glo pouvait être utilisé dans ces conditions même si le bruit de fond s'est révélé bien plus important qu'avec l'enzyme purifiée.

Le seul défaut observé dans l'utilisation du kit GDP-Glo concerne la variation, d'une expérience à l'autre, des valeurs des gammes étalon (Figure V.10). Selon le protocole recommandé, l'enzyme GDP-Glo est conservée à -20°C et décongelée à chaque utilisation.

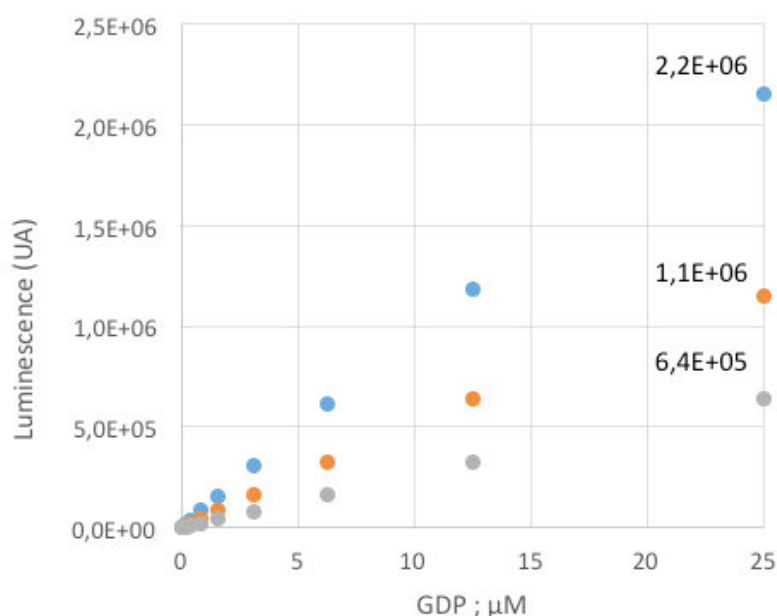


Figure V.10 : gammes de GDP mesurées à deux jours d'intervalle chacune.

La gamme avec les valeurs de luminescence les plus hautes a été réalisée en première et celle avec les valeurs les plus basses en dernière.

Les variations entre chacune de ces gammes sont probablement dues à une sensibilité de l'enzyme « GDP-Glo » aux cycles de congélation décongélation. De manière à résoudre ce problème, le protocole fourni par l'entreprise implique désormais une étape

intermédiaire de dilution de l'enzyme GDP-Glo de manière à l'aliquoter en tubes et limiter les cycles de congélation - décongélation.

Ce système de mesure peut facilement être employé pour comparer des lots d'enzymes, rechercher des inhibiteurs, ou cribler des activités GTs. Les principales limitations à cette technique sont l'investissement pour un luminomètre et le prix des réactifs. Les kits, selon qu'ils contiennent le matériel pour 200, 400 ou 4000 tests, coûtent respectivement 300, 500 et 2100 €. Le GDP-Fuc ultra pure coûte 200 € pour 50 µl à 50 µM, ce qui permet de réaliser à peu près 500 – 1000 tests.

## V.4. Conclusion

Le test des différentes techniques mentionnées a pour but de faciliter le criblage et les mesures d'activité GT au laboratoire.

**Le test radioactif** actuellement employé est à peu près aussi coûteux que le test commercial à base de luminescence, en ne prenant en compte que le GDP-[<sup>14</sup>C]-Fuc et pas la gestion des déchets radioactifs. De plus, certains nucléotides sucres radio-marqués sont très difficiles à se procurer voir inexistantes, ce qui rend impossible la détection ou le dosage de certaines activités. Surtout, la technique actuelle est longue à mettre en œuvre et ne permet pas d'effectuer rapidement un nombre important de tests : les échantillons sont traités en tubes 1,5 ml, la résine employée doit être lavée, centrifugée, etc. Tout cela est réalisé dans une pièce dédiée, à l'opposée du bâtiment, par une personne spécialement formée. Enfin, aucune modernisation ne peut être envisagée, puisque que la pièce dédiée à la manipulation de matériel radioactif sera fermée dans les années à venir. Le seul avantage notable de cette méthode de détection est de pouvoir travailler avec du surnageant de milieu ou des lysas bactériens non purifiés : aucune molécule radioactive de l'échantillon ne peut interférer significativement avec la mesure.

**Tableau V.3 : Quelques éléments de comparaison entre technique à base de radioactivité, malachite et luminescence.**

Les prix des réactifs spécifiques à chaque technique sont donnés pour un dosage de transfert de fucose : il s'agit du GDP-[<sup>14</sup>C]-Fuc pour la radioactivité et du kit détection GDP-Glo pour la luminescence. La valeur du débit des tests est plus subjective. Elle tient compte du format employé (tubes 1,5 ml ou plaque 96 puits) et du temps de préparation de la solution réactive. Cela n'inclut pas en revanche les mises aux points et répétitions de l'expérience pour être dans la gamme de mesure.

|                                      | Radioactivité | Malachite | Luminescence |
|--------------------------------------|---------------|-----------|--------------|
| Prix réactifs spécifiques (€ / test) | 0,9           | ≈ 0       | 0,5 – 1,5    |
| Quantité d'enzyme – (ng / test)      | 40 – 400      | 40 – 400  | 10 – 100     |

| Débit (Ech / heure) | 10 | 100 | 200 |
|---------------------|----|-----|-----|
|---------------------|----|-----|-----|

**Le test à base de malachite** permet, en utilisant des réactifs du laboratoire, de cribler un grand nombre de réactions par plaque 96 puits à moindre coût. La méthode de détection est toutefois très sensible aux différentes contaminations en NDP et phosphates. L'étendue de la gamme de détection étant faible, cela implique généralement quelques jours de mise au point avant d'obtenir une série de mesures interprétables. La version commerciale du test revient à 2,7 € / échantillon, ce qui rend le kit non compétitif.

**La technique à base de luminescence** est la plus sensible et la plus versatile. L'ampleur de la gamme de mesure et la simplicité de préparation de la solution réactive permettent d'effectuer un grand nombre de réactions par plaque 96 puits, en un minimum de temps. Le fait de quantifier un NDP spécifique limite fortement le bruit de fond, mais la possibilité de travailler avec du surnageant de milieu reste à confirmer. Ce test permet actuellement de doser l'UDP ou le GDP, qui correspondent aux NDP de la majorité des donneurs. Ce test est particulièrement valable pour des dosages d'activité précis, par exemple pour déterminer des paramètres cinétiques, cribler des inhibiteurs ou des banques d'accepteurs, avec une enzyme purifiée.

**Les tests SPR** n'ont pas fonctionnés avec l'enzyme AtFuT1 mais le concept est original. Il serait intéressant de chercher à optimiser la densité de fixation des oligosaccharides sur la puce et la longueur des *linkers*. Les mises au point avec cette technique nécessitent toutefois de disposer d'importantes quantités d'enzymes fraîchement purifiées, puisque chaque injection d'1 ml consomme entre 1 et 20 µg de protéine.

Le [tableau V.4](#) synthétise les applications optimales pour chacune des techniques actuellement utilisables au laboratoire.

**Tableau V.4 : possibilité de mise en œuvre de chaque technique disponible au laboratoire**

| test :              | condition d'utilisation :                 | Criblage :                                                | mesure d'activité :                         |
|---------------------|-------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| <b>malachite</b>    | Enzyme purifiée                           | Oui : accepteur peu onéreux - donneurs                    | Comparaisons d'échantillons                 |
| <b>luminescence</b> | Surnageant de culture ? - enzyme purifiée | Oui : accepteurs onéreux et / ou partiellement identifiés | Caractérisation des paramètres enzymatiques |

|                      |                                                      |                                               |                               |
|----------------------|------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|-------------------------------|
| <b>radioactivité</b> | Surnageant, lysat<br>de cellules, enzyme<br>purifiée | Non : Confirmation de<br>transfert uniquement | Comparaison<br>d'échantillons |
|----------------------|------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|-------------------------------|

La mise en place du système de mesure d'activité par luminescence serait, à priori, le meilleur moyen de supprimer ou de limiter fortement l'usage de la radioactivité par l'équipe.

---

## **Chapitre VI : Cristallisation d'AtFuT1**

---



# VI. Cristallisation d'AtFuT1

## VI.1. Obtention de cristaux

### ➤ Conditions de cristallisation

Le premier criblage utilisé pour AtFuT1 a été le *sparse matrix* « structure screen 2 » commercialisé par « molecular dimensions ». Il s'agit d'un test standard, qui permet d'identifier des conditions initiales à partir d'une grande variété de précipitants, pH et tampons. Ce premier criblage a été effectué à 21°C avec une protéine concentrée à 10 mg/ml dans un tampon HEPES 25 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4. Une quinzaine de conditions (sur 50) ont été identifiées comme prometteuses : soit du fait de la présence de micro-cristaux, soit de séparations de phases. Parmi les quinze conditions identifiées, six contenaient du PEG (entre 100 et 20000 Da). Plusieurs « grid screen » ont donc été effectués autour de ces conditions en utilisant du PEG de différentes tailles. Le PEG 8 K a permis d'obtenir régulièrement des petits cristaux instables ou des séparations de phases. **Globalement, des cristaux ont pu être formés fréquemment avec l'utilisation de PEG 8 K dans un intervalle de pH de 7 à 8 en tampon HEPES, avec 7 ou 10 mg de protéine par ml.** À 7 mg/ml, avec 250 à 500 mM de NaCl, la protéine a tendance à cristalliser à des concentrations en PEG 8 K de 14 – 16 % (m/v) à 4°C. Dans les mêmes conditions à 21°C, les concentrations de PEG auxquelles les cristaux apparaissent sont de 18 – 22 %. D'autres conditions permettant d'obtenir des cristaux ont été trouvées avec le kit commercial « Clear strategy Screen I MD1-14 ». La protéine est utilisée à 7 mg/ml et la plaque incubée à 21°C. Cinq conditions permettant d'obtenir des cristaux ont été identifiées :

Tableau VI.1 : conditions induisant la formation de cristaux avec le kit « clear strategy Screen I MD-1-14 »

Ce kit est fourni par *Molecular Dimension*. Le tampon HEPES-NaOH pH 7,5 est employé dans toutes les conditions.

| N°= | condition                           | Temps d'apparition |
|-----|-------------------------------------|--------------------|
| 1   | 0,3 M Na acétate ; 25 % PEG 2 K MME | 5-8 jours          |
| 4   | 0,2 M KBr ; 25 % PEG2 K MME         | > 30 jours         |
| 5   | 0,2 M KSCN ; 25 % PEG 2 K MME       | 5-8 jours          |

6 0,8 M Na formate ; 25 % PEG 2 K MME > 30 jours

7 0,3 M Na acétate 15 % PEG 4K 5-8 jours

Les conditions 1 et 7 étant très proches, elles ont été sélectionnées pour être affinées par un « grid screen ». Ces *grid screens* ont été effectués autour de la condition n°=7 : de 10 à 20 % de PEG 4 K entre les pH de 7 à 8 (par incréments de 1 puis 0,3) et entre 0 et 500 mM de Na-acétate (par incréments de 50 mM).

Au final, deux gammes de conditions permettent d'obtenir des cristaux de manière reproductible (Figure VI.1). La protéine doit pour cela être utilisée dans les quelques jours après sa purification.

|             | pH:  | 0 mM NaCl |     |     |             | 250 mM NaCl |     |     |     |
|-------------|------|-----------|-----|-----|-------------|-------------|-----|-----|-----|
|             |      | 6,8       | 7,2 | 7,5 | 7,8         | 6,8         | 7,2 | 7,5 | 7,8 |
| PEG 8 K     | 18%  | A1        | A2  | A3  | A4          | A5          | A6  | A7  | A8  |
|             | 20%  | B1        | B2  | B3  | B4          | B5          | B6  | B7  | B8  |
|             | 22%  | C1        | C2  | C3  | C4          | C5          | C6  | C7  | C8  |
|             | 18%  | D1        | D2  | D3  | D4          | D5          | D6  | D7  | D8  |
|             | 20%  | E1        | E2  | E3  | E4          | E5          | E6  | E7  | E8  |
|             | 22%  | F1        | F2  | F3  | F4          | F5          | F6  | F7  | F8  |
|             | pH : | 6,8       | 7,2 | 7,5 | 7,8         | 6,8         | 7,2 | 7,5 | 7,8 |
| 500 mM NaCl |      |           |     |     | 750 mM NaCl |             |     |     |     |

|                              | pH:  | 200 mM NaCH <sub>3</sub> COO |     |    |                              | 300 mM NaCH <sub>3</sub> COO |     |    |     |
|------------------------------|------|------------------------------|-----|----|------------------------------|------------------------------|-----|----|-----|
|                              |      | 7                            | 7,5 | 8  | 8,2                          | 7                            | 7,5 | 8  | 8,2 |
| PEG 4 K                      | 20%  | A1                           | A2  | A3 | A4                           | A5                           | A6  | A7 | A8  |
|                              | 22%  | B1                           | B2  | B3 | B4                           | B5                           | B6  | B7 | B8  |
|                              | 24%  | C1                           | C2  | C3 | C4                           | C5                           | C6  | C7 | C8  |
|                              | 20%  | D1                           | D2  | D3 | D4                           | D5                           | D6  | D7 | D8  |
|                              | 22%  | E1                           | E2  | E3 | E4                           | E5                           | E6  | E7 | E8  |
|                              | 24%  | F1                           | F2  | F3 | F4                           | F5                           | F6  | F7 | F8  |
|                              | pH : | 7                            | 7,5 | 8  | 8,2                          | 7                            | 7,5 | 8  | 8,2 |
| 400 mM NaCH <sub>3</sub> COO |      |                              |     |    | 500 mM NaCH <sub>3</sub> COO |                              |     |    |     |

Figure VI.1 : Schémas des conditions permettant d'obtenir des cristaux d'AtFuT1.

Plaques de 48 puits (Hampton), 0,1 ml par réservoir. Les gouttes sont réalisées avec 1 µl de solution de réservoir et 1 µl de protéine à 7 mg/ml, puis les plaques maintenues à 21°C. Le type de PEG (4 ou 8 K) et sa concentration ainsi que la nature du sel utilisé sont les paramètres les plus importants. Les concentrations de sels et le pH influencent moins le temps de formation des cristaux ou leur probabilité d'apparition.

Avec les deux gammes sélectionnées, les cristaux apparaissent en premier aux concentrations de PEG les plus importantes (6 – 7 jours), et plus tard aux concentrations faibles (10-15 jours). Ce sont à ces concentrations qu'ils deviennent aussi les plus gros. Les conditions précises dans lesquelles apparaissent les cristaux au sein de ces gammes

sont légèrement variables, d'un lot de protéines à l'autre. C'est la raison pour laquelle il n'a pas été possible d'affiner davantage le criblage.

### ➤ **Caractéristiques des cristaux obtenus**

Les longueurs, épaisseurs et tailles des cristaux obtenus varient fortement entre les conditions et au sein d'une même goutte (Figure VI.2).

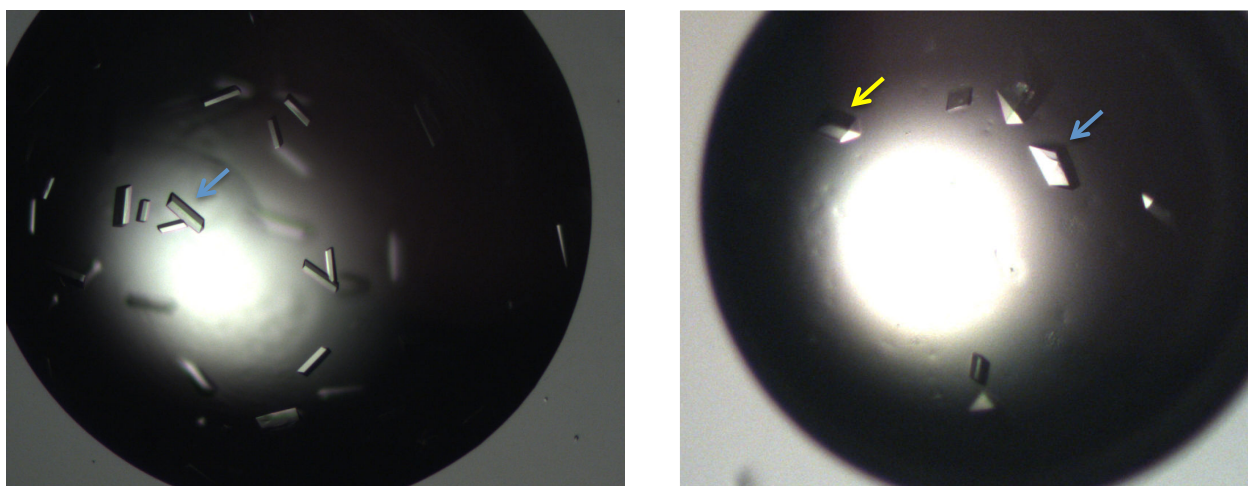


Figure VI.2 : Allure des cristaux d'AtFuT1 fréquemment obtenus.

Condition gauche : 20 % PEG 8K, 500 mM NaCl, 100 mM HEPES pH 7,5 ; Conditions droite : 18 % PEG 8K, 500 mM NaCl, 100 mM HEPES pH 7,8.

Cette caractéristique est probablement due à l'hétérogénéité intrinsèque des molécules de protéine et entre les différents lots de protéines purifiées. Surtout, ils poussent fréquemment sur une membrane située à l'interface des deux phases formées dans la goutte rendant difficile leur prélèvement (Figure VI.3).

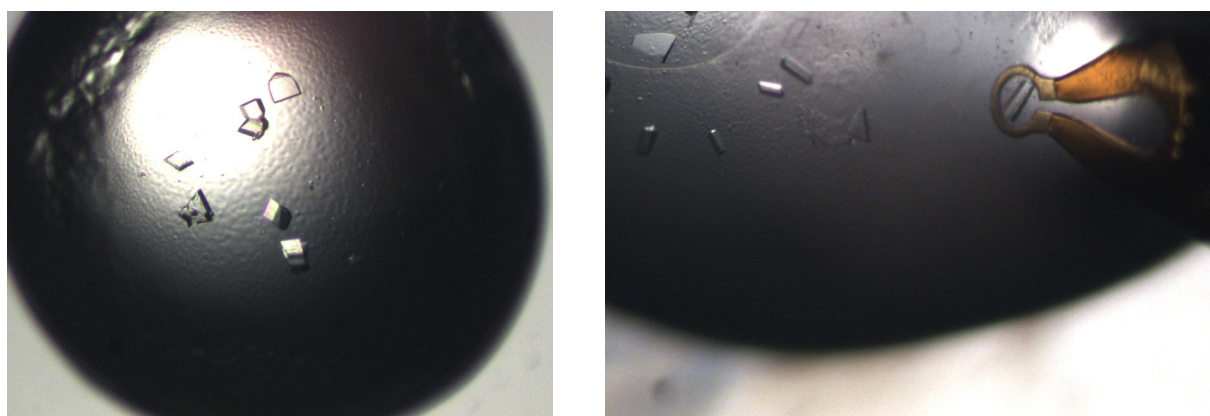


Figure VI.3 : Cristaux d'AtFuT1 fixé à une membrane

A gauche, attachés à la membrane, visible sur la photo (20 % PEG 4K, 500 mM NaCH<sub>3</sub>COO, pH 8) ; à droite : en train d'être prélevés (« pêchés ») manuellement pour être transférés dans une solution de cryoconservation (22 % PEG 4K, 500 mM NaCH<sub>3</sub>COO, pH 7,5).

Les jeux de données collectés sur les premiers cristaux passés au synchrotron atteignent des résolutions de 2,5 – 3 Å. Ces mesures de diffractions ont permis d'identifier deux dimensions de mailles présentant des caractéristiques différentes (Tableau VI.2). La maille 1 est constituée de deux monomères d'AtFuT1 et la maille 2 de quatre monomères.

Tableau VI.2 : les dimensions des deux mailles cristallines régulièrement mesurées :

|          | Groupe d'espace | a (Å) | b (Å) | c (Å) | $\beta$ (°) | Nombre de monomères |
|----------|-----------------|-------|-------|-------|-------------|---------------------|
| Maille 1 | P2 <sub>1</sub> | 88    | 83    | 150   | 96          | 4                   |
| Maille 2 | P2 <sub>1</sub> | 81    | 78    | 87    | 115         | 2                   |

### ➤ Choix du cryoprotectant

Les PEGs 4K et 8K ne sont pas cryoprotectants aux concentrations utilisées pour la formation des cristaux d'AtFuT1. Plusieurs solutions ont donc été testées pour préserver les cristaux. La méthode utilisée consiste à les prélever de leur solution de cristallisation, pour les tremper dans le cryoprotectant. Dans un premier temps, une observation au microscope permet d'observer une éventuelle dégradation du cristal (éclatement, apparition de fissures,...) puis des mesures de diffraction confirment la qualité des données de diffractions recueillies.

La condition retenue consiste à ajouter 15 % d'éthylène glycol à la solution de cristallisation. Puisque les concentrations de sels et le pH semblent avoir peu d'effet sur les cristaux, seules deux solution cryoprotectantes sont réalisées, choisies en fonction de la solution mère des cristaux :

- Solution cryo # 1 : 100 mM HEPES pH 7,5 ; 18 % de PEG 8 K, 500 mM NaCl ; 15% EG)
- Solution cryo # 2 : 100 mM HEPES pH 7,5 ; 20% de PEG 4 K ; 500 mM Na acétate ; 15% EG)

Cette méthode de conservation des cristaux améliore en moyenne la qualité des données de diffraction et les résolutions obtenues : à 2 – 2,5 Å pour environ 1/5 des cristaux pêchés.

## VI.2. Résolution de la structure

Aucune des fucosyltransférases ni autres GTs dont la structure est disponible dans la PDB ne peut servir de modèle dans le cas d'AtFuT1. La structure la plus proche identifiée est FUT8, avec 21 % d'identité. Les phases ont donc dû être déterminées de manière expérimentale.

### VI.2.1. Obtention de cristaux dérivés pour le phasage expérimental

#### ➤ Production de sélénoprotéine

Aucun milieu Ex-Cell 405 sans méthionine n'est disponible sur le marché. Pour cette expérience, les cellules (High-five) ont donc été cultivées en milieu SF900II (Life Science). Le milieu SF900II est disponible sous forme standard et sans méthionine ni cystéine. Ces deux acides aminés peuvent être ajoutés extemporanément, et la méthionine peut donc être substituée par de la sélénométhionine. Deux essais de production d'AtFuT1 sélénée ont été tentés dans les conditions décrites dans le chapitre [Matériels et Méthodes](#), mais sans succès. Aucun pic de protéine n'a été observé durant les étapes de purification par IMAC que ce soit sur le chromatogramme de l'appareil ou par gel SDS-PAGE. Il se peut que la centrifugation des cellules (1000xg) avant de passer en milieu séléné ait été trop rapide. Cette méthode étant réputée difficile à mettre en œuvre avec des cellules d'insectes, les efforts ont été concentrés en partie sur la co-cristallisation et principalement sur le *soaking* (ou trempage) avec des métaux lourds.

#### ➤ Introduction d'atomes lourds par co-cristallisation ou trempage

La co-cristallisation consiste à cristalliser la protéine liée à un composé d'intérêt : une molécule contenant un atome lourd, un substrat, un métal,... . Les conditions de cristallisation initialement définies sont généralement conservées lors de l'introduction d'un atome lourd. Quelques essais préliminaires ont été effectués avec les molécules suivantes :  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{HOCl}_3$ ,  $\text{C}_2\text{H}_5\text{HgOH}_2\text{PO}_3$ ,  $\text{ZnOOCCH}_3$ , mais sans succès.

Les essais de trempage des cristaux ont été réalisés directement dans leurs solutions de cryoprotectants ([Tableau VI.4](#)).

**Tableau VI.3 : Criblage de composés à pouvoir phasant.**

La présence du composé dans le cristal observée lors du scan de fluorescence est indiquée par coche et son absence par une croix.

| composé | condition de cristallisation | Concentration du composé | Temps d'incubation | Présence dans le cristal |
|---------|------------------------------|--------------------------|--------------------|--------------------------|
|---------|------------------------------|--------------------------|--------------------|--------------------------|

|                                                                 |         |       |       |   |
|-----------------------------------------------------------------|---------|-------|-------|---|
| KI                                                              | #2      | 1 M   | 2h    | X |
| CsCl                                                            | #2      | 1 M   | 2h    | X |
| RbCl                                                            | #2      | 0.5 M | 2h    | X |
| NaBr                                                            | #2      | 0.5 M | 2h    | X |
| RbCl                                                            | #2      | 0.5 M | 2h    | X |
| ZnCl <sub>2</sub>                                               | #1 - #2 | 20 mM | 30 mn | X |
| HoCl <sub>3</sub>                                               | #1 - #2 | 20 mM | 30 mn | X |
| K <sub>2</sub> PtCl <sub>4</sub>                                | #1 - #2 | 25 mM | 1h    | ✓ |
| K <sub>2</sub> Pt(CN) <sub>4</sub>                              | #1 - #2 | 15 mM | 1h    | X |
| K <sub>2</sub> Pt(NO <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>                | #1 - #2 | 15 mM | 1h    | X |
| C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> HgOH <sub>2</sub> PO <sub>3</sub> | #2      | 10 mM | 1h    | ✓ |
| C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> HgBr <sub>4</sub>                 | #1 - #2 | 15 mM | 1h    | X |
| C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> Hg                                | #1 - #2 | 15 mM | 1h    | X |
| I <sub>3</sub> C                                                | #1 - #2 | 0,5 M | 1h    | X |

Ce premier criblage a permis d'identifier deux molécules (K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub> et C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>HgOH<sub>2</sub>PO<sub>3</sub>) capables d'entrer dans les cristaux utilisés et de modifier le profil de diffraction. Les conditions ont alors été variées et répétées, de manière à obtenir de meilleurs jeux de données. Mais la maille du cristal a toujours été modifiée en proportion trop importante pour pouvoir exploiter les cristaux par la technique de MIR (*multiple isomorphous replacement*). La méthode de MAD (*multiple anomalous diffraction*) n'a pas pu être employée non plus, du fait de la trop faible intensité du signal anomal.

**La solution est venue avec l'utilisation de clusters d'atomes lourds, créés spécifiquement pour le phasage expérimental, et qui possèdent un pouvoir phasant démultiplié par le nombre d'atomes qui les composent.** L'intensité du signal anomal obtenu facilite l'utilisation de la technique de MAD pour phaser à partir d'un cristal unique. C'est grâce à l'utilisation du bromure de tantale (Ta<sub>6</sub>Br<sub>12</sub>) que nous avons pu résoudre la structure d'AtFuT1.

Les conditions initiales de trempage ont été effectuées telles que recommandé par le fournisseur (Jena Bioscience): 1 mM final en solution de stabilisation (cryo). L'optimisation des conditions a été effectuée avec des cristaux obtenus en condition de PEG 8K, et en variant les temps de trempage (entre 3 heures et 9 jours). L'une des conditions après 24 h de trempage, a permis d'obtenir des données de qualité suffisante

pour calculer les phases. Ces dernières ont servi à créer un modèle de la structure d'AtFuT1 à une résolution de 2,9 Å. Ce modèle a ensuite été combiné à des jeux de données issus de cristaux natifs de meilleures résolutions. **Cette partie du travail a été réalisée la Dr Joana Rocha, en post-doc de biologie structural au CERMAV et Daniele de Sanctis, bio-physicien à l'ESRF (European Synchrotron Radiation Facility).**

## VI.2.2. Obtention de complexe enzyme substrat

L'obtention d'un complexe enzyme-substrat apporte bien plus d'informations qu'une structure de la protéine uniquement. Cela permet notamment d'identifier quels sont les acides aminés impliqués dans la liaison des substrats et dans la catalyse. Ces informations peuvent alors aider à comprendre le mécanisme réactionnel de l'enzyme, permettre la modélisation d'autres substrats dans le site actif, et sont une précieuse aide pour toute stratégie d'ingénierie enzymatique. Un complexe enzyme substrat peut s'obtenir par co-cristallisation ou par trempage.

De nombreux essais ont été réalisés par co-cristallisation ou trempage avec le GDP-fucose seul ou encore avec le GDP + accepteur. L'accepteur utilisé est le motif XLLG, possédant un seul site d'addition du fucose. Dans le cas du complexe avec le GDP-fucose, les meilleurs jeux de données ont été obtenus par trempage court (3 min) avec du GDP-fucose 5 mM. Dans le cas du complexe ternaire, le trempage a été réalisé avec une solution contenant du GDP 10 mM et 7 mg/ml de XLLG pendant des périodes de 5 min à 14h.

Au final, 3 jeux de données ont été exploités : apo-AtFuT1<sub>Δ68</sub> (sans ligand), et les complexes AtFuT1<sub>Δ68</sub>:GDP-fucose et AtFuT1<sub>Δ68</sub>:GDP:XLLG, avec une résolution de 2.1, 2.5 et 2.2 Å, respectivement. Ces cristaux sont dans le groupe d'espace P2<sub>1</sub> et contiennent 4 molécules indépendantes dans l'unité asymétrique organisées en dimères ([Figure VI.4](#)).

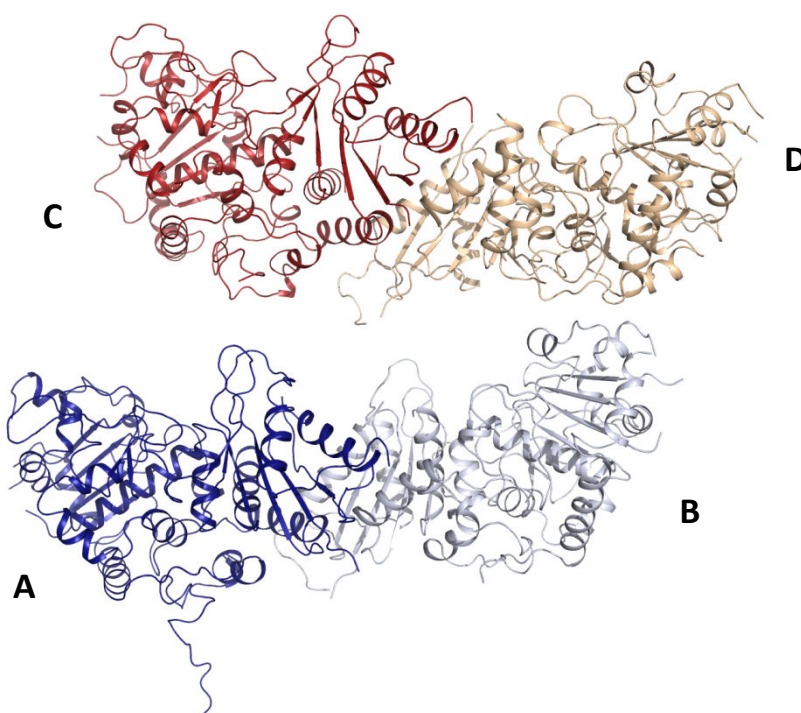


Figure VI.4 : Organisation d'AtFuT1 dans le cristal

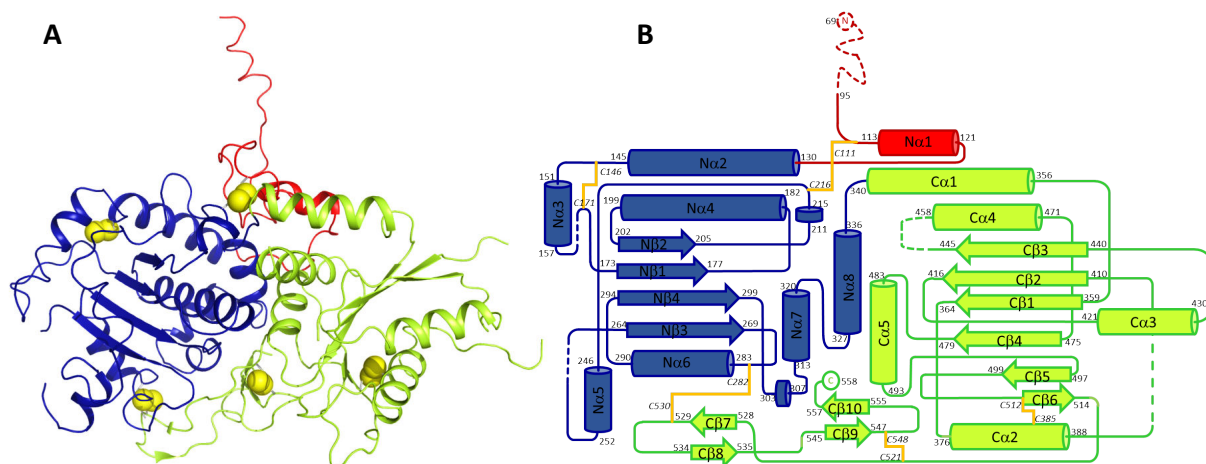
Quatre monomères d'AtFuT1<sub>Δ68</sub> agencés en dimères sont observés dans l'unité asymétrique principalement observée (correspondant à la maille 1, Tableau V.2). Figure de J. Rocha.

Dans le complexe avec le GDP-fucose, la densité électronique observée révèle une occupation partielle du GDP (visible dans seulement 3 monomères) et une absence de fucose. L'absence de fucose peut être attribuée à l'hydrolyse du nucléotide-sucre au cours de l'expérience ou à du désordre. Les données concernant le complexe AtFuT1<sub>Δ68</sub>:GDP:XLLG sont de meilleure qualité (2.2 Å) et la position du GDP, retrouvée dans les 4 monomères, est similaire à celle observée dans le complexe avec GDP-fucose. L'accepteur XLLG n'est présent que dans 2 monomères sur 4.

## VI.3. Observations structurales préliminaires

### VI.3.1. Architecture de l'enzyme

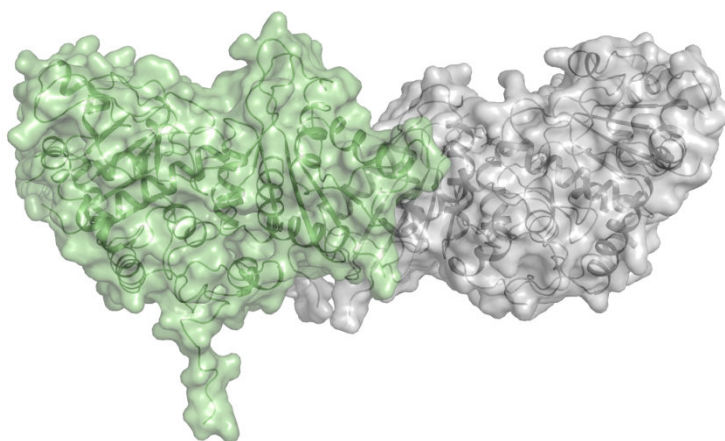
AtFuT1 adopte à première vue un repliement proche du GT-B classique, c'est-à-dire formé de deux domaines séparés de type Rossmann (Figure VI.5).



**Figure VI.5 : Structure du monomère d'AtFuT1<sub>Δ68</sub>**

**A:** région tige en rouge, domaines N-term et C-term sont représentés en bleu et vert, respectivement. Les ponts disulfures sont représentés par des sphères jaunes **B:** Diagramme décrivant la topologie des deux domaines. Les mêmes couleurs sont utilisées qu'en A. Figure de J. Rocha.

Ce type de repliement est donc proche de celui des autres fucosyltransférases cristallisées à ce jour (FUT8, NODZ, POFUT1 et POFUT2) (Brzezinski et al., 2007 ; Ihara et al., 2007 ; Lira-Navarrete et al., 2011 ; Chen et al., 2012). Cependant des différences substantielles sont observées dans la topologie des domaines N-terminal et C-terminal, créant ainsi un nouveau variant du repliement GT-B. AtFuT1<sub>Δ68</sub> se présente dans le cristal sous forme de dimères, liés au niveau de leurs parties C-terminales par de nombreuses liaisons ioniques et hydrogènes avec une surface d'interaction d'environ 1200 Å<sup>2</sup> (Figure VI.6).



**Figure VI.6 : Représentation du dimère d'AtFuT1<sub>Δ68</sub>**

**AtFuT1<sub>Δ68</sub> est un dimère associé par les extrémités C-terminales de chaque monomère. Figure de J. Rocha.**

Comme prédit par le serveur Dianna et par les alignements de séquences, tous les résidus cystéine d'AtFuT1<sub>Δ68</sub> qui sont conservés au sein des séquences de la famille GT37 (soit 10 cystéines sur 11) sont impliqués dans des ponts disulfures. Ces ponts disulfures semblent avoir un rôle structural important puisqu'on les observe dans des

régions faiblement structurées. En revanche, l'appariement des cystéines tel que proposé par Dianna est totalement erroné. La caractérisation biochimique d'AtFuT1 $_{\Delta 68}$  indique que les deux sites potentiels de N-glycosylation (N88 et N504) sont probablement occupés d'après les tailles obtenues en MALDI-TOF. Dans la structure, ces résidus sont exposés au solvant et les chaînes glycaniques sont observées de façon ambiguë car trop désordonnées.

Le début du domaine catalytique peut-être estimé autour du résidu 130. La portion [69-129] correspond à la région tige de l'enzyme (Figure VI.6). De la densité électronique pour cette région tige n'a été observée que dans la forme apo-enzyme et seulement dans deux monomères sur les 4 (monomères A et D, figure VI.4).

### VI.3.2. Interaction entre AtFuT1 $_{\Delta 68}$ et ses substrats

La figure VI.7 montre la position des substrats GDP et XLLG dans le site actif de l'enzyme.

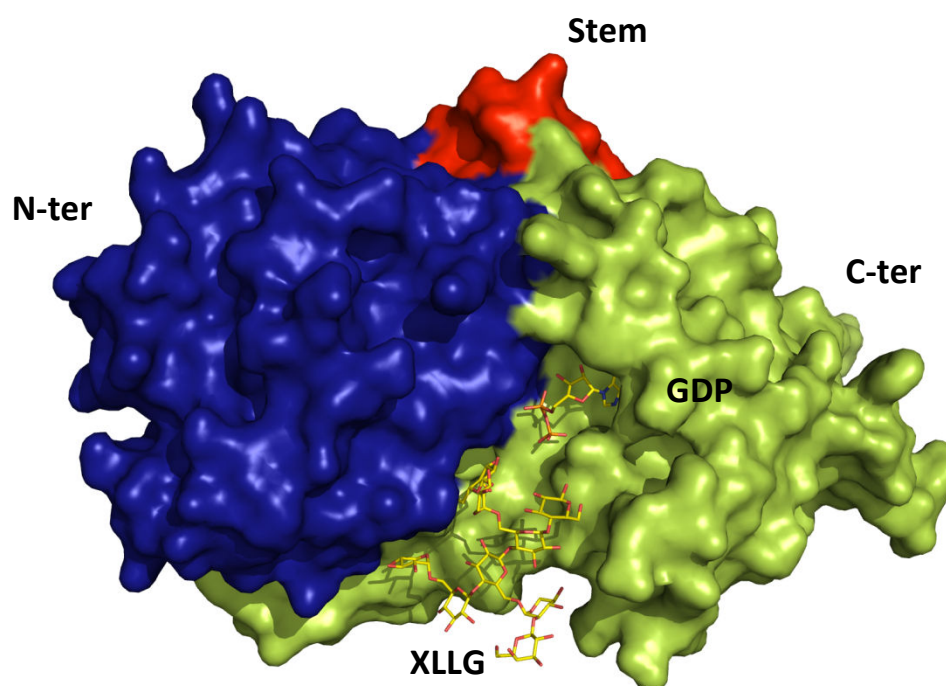


Figure VI.7 : AtFuT1 $_{\Delta 68}$  en complexe avec GDP et XLLG

Le fragment XLLG et le GDP sont tous deux placés à la surface de l'enzyme. Aucun changement de conformation n'est observé entre la structure Apo (sans substrats) et avec substrats. Figure de J. Rocha.

Les interactions avec le GDP impliquent principalement des résidus du domaine C-term (Figure VI.7). Les orientations et les distances respectives du GDP et du motif XLLG (Figure VI.8, figure VI.10) sont en cohérence avec la possibilité d'un transfert du groupement fucose sur le galactose de la troisième chaîne latérale (Gal3, nomenclature Figure VI.9). La base du GDP est « prise en sandwich » entre les résidus Phe484 et

Leu418 et le résidu E466 établit deux liaisons hydrogènes (LH) avec les atomes N1 et N2 de la guanine. Le ribose (O2) interagit avec His459 et le  $\beta$ -phosphate établit 4 LH avec les chaînes latérales des résidus Ser462, Thr483, Arg366 et l'amide de la chaîne principale de Phe484. Seuls le groupement  $\alpha$ -phosphate interagit avec des résidus du domaine N-term (Gly183 et Asn184).

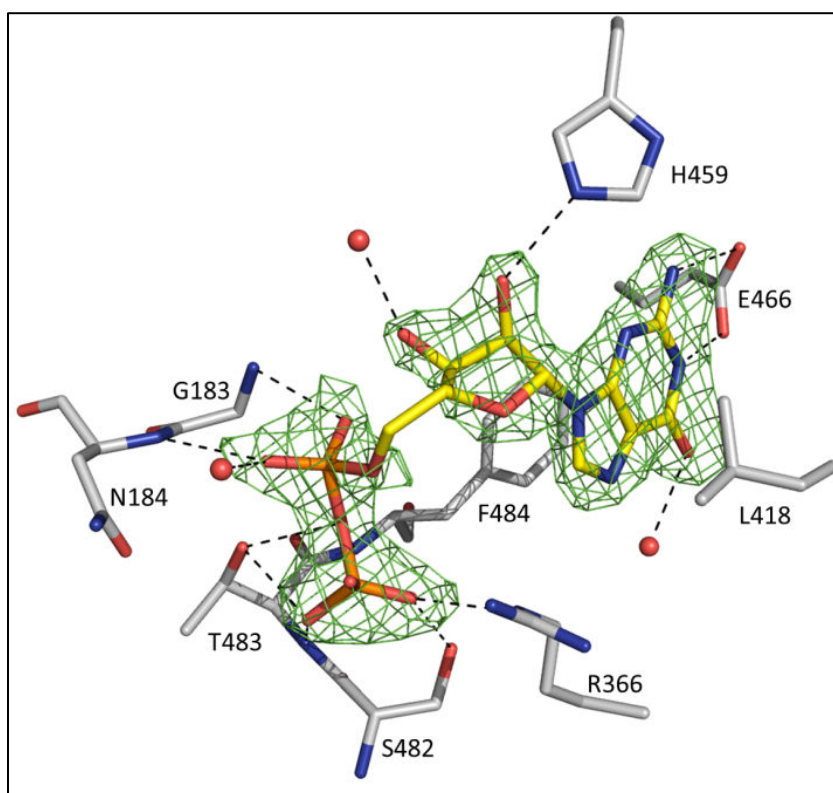


Figure VI.8 : Détails moléculaires de l'interaction entre AtFuT1 $\Delta$ 68 et le GDP

La guanosine et le ribose interagissent avec des résidus du domaine C-term. Seul le groupement  $\alpha$ -phosphate interagit avec des résidus du domaine N-term : Gly183 et Asn184. Figure de J. Rocha.

De manière à pouvoir discuter des interactions entre le motif XLLG et l'enzyme, une nomenclature spécifique des résidus de cet l'oligosaccharide sera employée (Figure VI.9) Au niveau du site accepteur, XLLG est maintenu en position principalement via des contacts avec les résidus Xyl1 et Gal3. Les résidus Xyl2 et Gal2 sont exposés au solvant. Xyl1 est maintenu par des contacts avec les résidus Lys278, Ser524 et Pro525. Le résidu Glc1 est maintenu grâce à un stacking avec Trp553.

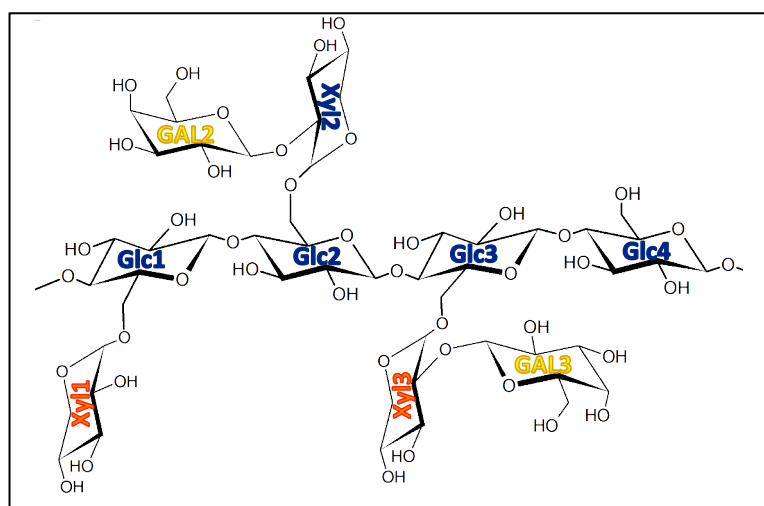


Figure VI.9 : Nomenclature des résidus formant le motif XLLG

Chaque résidu d'une chaîne latérale porte le numéro du glucose de chaîne principale correspondant. Figure de J. Rocha.

Les résidus Gal2, Xyl3 et Glc4 ne forment aucun contact direct ou indirect avec la protéine.

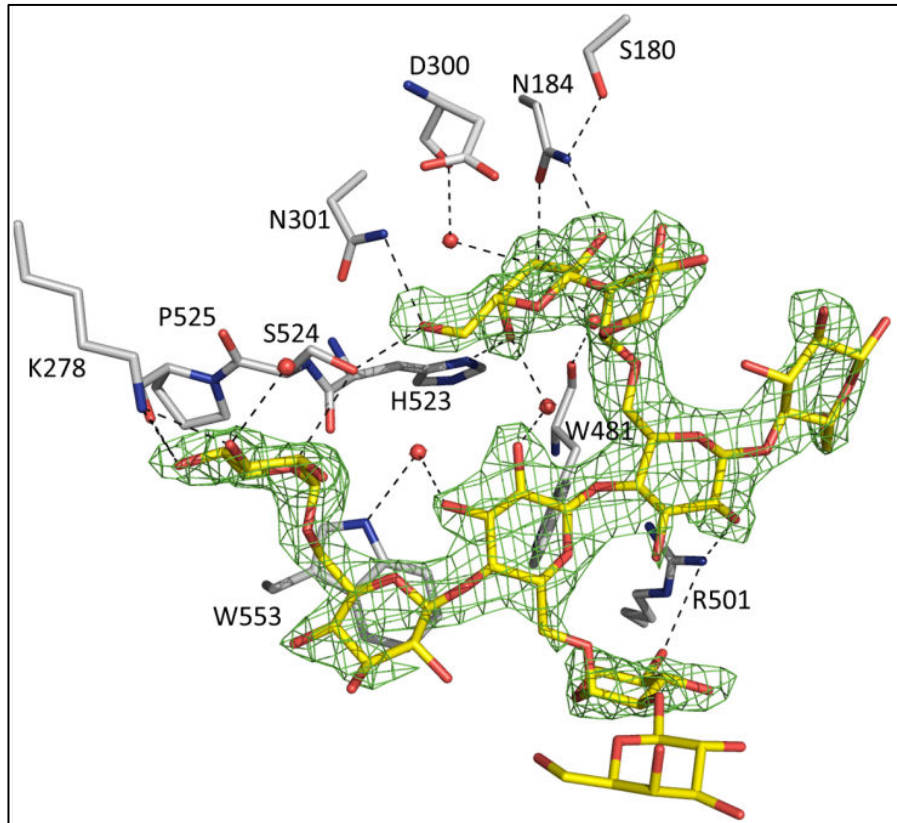


Figure VI.10 : Détails moléculaires de l'interaction d'AtFuT1<sub>Δ68</sub> avec l'accepteur XLLG

La majorité des interactions entre l'enzyme et l'oligosaccharide s'effectuent au niveau des chaînes latérales 1 et 3. Figure de J. Rocha.

Le résidu Gal3 établit de nombreuses LH avec les acides aminés suivants : Ser524, Asn301, His523, Asn184, et aussi Asp300 et Trp481 (via une molécule H<sub>2</sub>O). Un rôle dans la catalyse est postulé pour les résidus Ser180, Asn184 et Arg366. Des expériences de mutagenèse sont désormais en cours afin d'évaluer leur contribution dans l'activité d'AtFuT1

---

## **Chapitre VII : Conclusions et perspectives**

---



## VII. Conclusions perspectives

AtFuT1 est le seul gène d'*Arabidopsis thaliana* codant pour une activité fucosyltransférase du xyloglucane. Ce polysaccharide est l'un des constituants majeurs de la paroi des eudicotylédones. Utilisé dans de nombreuses applications industrielles (J. Kochumalayil et al., 2010) ce polymère est aussi très étudié pour la synthèse de gels, de films (Zhou et al., 2009 ; Zhang, Brumer, Ågren, & Tu, 2011 ; Araújo et al., 2012 ; J. J. Kochumalayil, Zhou, Kasai, & Berglund, 2013), ou pour son utilisation en tant que molécule thérapeutique (Liu et al., 2015). Comprendre son rôle exact dans la paroi ainsi que les propriétés induites par les différentes substitutions de ses chaînes latérales pourrait ouvrir de nouveaux champs d'applications. L'activité de l'enzyme AtFuT1, responsable de l'ajout de fucose sur du xyloglucane, a été démontrée dès 1999 (R. M. Perrin, 1999). Il s'agit de la première enzyme impliquée dans la synthèse d'hémicellulose à avoir été caractérisée. L'identification du gène *Atfut1* a induit la création d'une nouvelle famille de GT (la famille GT37) dans la base de données CAZy, du fait de sa faible homologie avec les séquences déjà renseignées. Les paramètres biochimiques et cinétiques de la FuT1 du pois (*Pisum sativum*) ont été déterminés peu de temps après (Faik, Bar-Peled, et al., 2000) puis, plus récemment, AtFuT1 a été utilisée pour démontrer la possibilité de synthétiser du xyloglucane, fucosylé *in-vitro* (Spadiut et al., 2011). Cependant, aucune méthode efficace de purification de cette enzyme n'a été publiée. La synthèse du xyloglucane chez la plante, son rôle et celui de la fucosylation de ce polysaccharide font pourtant l'objet de nombreuses études (Peña, Ryden, Madson, Smith, & Carpita, 2004 ; Hoffman et al., 2005 ; Cavalier et al., 2008 ; Brennan & Harris, 2011 ; Y.-H. Chou et al., 2014 ; Lund et al., 2014b). De façon plus large, le fucose est impliqué dans de nombreuses fonctions biologiques et les fucosyltransférases sont des cibles pour le développement de molécules innovantes, notamment dans le domaine de la santé. Notamment, plusieurs structures de fucosyltransférases servent à la recherche d'inhibiteurs performants de ces enzymes, impliquées dans différentes pathologies (Ahsen et al., 2008 ; Lira-Navarrete et al., 2011 ; Serna, Yan, Martin-Lomas, Wilson, & Reichardt, 2011 ; Kötzler et al., 2013). La disponibilité de données structurales et mécanistiques concernant ce type d'enzyme ouvre aussi des perspectives d'ingénierie enzymatiques prometteuses (cf [Introduction](#)).

L'objectif principal de ce doctorat était double : (i) utiliser AtFuT1 dont la fonction est connue pour mettre au point des tests innovants de criblage d'activités GT et (ii) obtenir des données biochimiques et structurales sur cette enzyme. Ces objectifs m'ont amené dans un premier temps à mettre au point une méthode de production de l'enzyme dans un système hétérologue, puis dans un second temps, une méthode de purification d'AtFuT1. Ces deux objectifs ont été atteints.

J'ai d'abord exploré la possibilité d'exprimer AtFuT1 chez *Escherichia coli*, ce système bactérien étant de loin le plus performant en termes de quantités de protéines produites et de coût. Plusieurs combinaisons de cellules hôtes et de vecteurs disponibles au laboratoire ont été essayées, sans succès : la protéine étant produite majoritairement en corps d'inclusion. Nous pensons aujourd'hui que ces échecs sont dus aux nombreux ponts disulfures et, potentiellement, aux sites de N-glycosylation qui semblent nécessaires pour le repliement correct et la stabilité de la protéine. Le système baculovirus-cellules d'insectes a finalement été retenu et le choix a été de produire la protéine recombinante dans le milieu de culture. Si ce système permet généralement de produire des protéines eucaryotes complexes sous forme active, le rendement en protéine restant très faible comparé au système bactérien. Une partie importante de mon travail a été concentrée sur l'optimisation de la production d'AtFuT1 dans ce système. J'ai notamment implanté au laboratoire une méthode de culture de cellules d'insectes en suspension, qui permet d'obtenir des volumes importants de surnageant de culture.

La protéine recombinante a été exprimée sous forme tronquée (délétée des 68 premiers résidus) avec l'ajout d'une étiquette (His)<sub>6</sub> et Xpress à son extrémité N-terminale. La première étape du protocole de purification a impliqué une chromatographie d'affinité sur colonne His-trap. Je me suis heurté à de nombreuses difficultés techniques pour la purification d'AtFuT1<sub>Δ68</sub> à partir de son milieu de production (lessivage de colonne, précipitation du milieu,...), mais un protocole a finalement été mis au point. L'arrivée sur le marché de nouveaux types de colonnes (cOmplete His-Tag Roche, His-Trap™ excel, GE) a été un tournant « technologique » clé du projet. Le protocole employé permet d'obtenir 3 mg de protéines par litre de culture en sortie d'His-Trap. Une seconde étape de filtration sur gel s'est avérée nécessaire pour obtenir une préparation suffisamment pure et homogène d'AtFuT1<sub>Δ68</sub> pour la cristallisation. Le rendement en protéines après cette seconde étape est d'environ 1,5 mg à partir d'1 L de culture. La protéine est stable et peut être conservée plusieurs jours à 4°C. La qualité de la protéine produite a permis d'obtenir les premiers cristaux de la protéine et ainsi de résoudre la structure tridimensionnelle d'AtFuT1<sub>Δ68</sub>.

Les données biochimiques et structurales obtenues pour AtFuT1 permettent aujourd'hui de mieux comprendre le fonctionnement de l'enzyme. Tout d'abord, l'unité fonctionnelle de l'enzyme est le dimère. Cette caractéristique a été démontrée par gel filtration et confirmée dans la structure cristallographique. Ce dimère est relié uniquement par des liaisons non covalentes comme le montrent les résultats par SDS-PAGE en conditions réductrices et non réductrices. AtFuT1 est riche en cystéine (11 résidus dans la forme soluble exprimée) et la structure 3D montre que 10 de ces résidus sont impliqués dans des ponts disulfures intra-chaînes. La seule cystéine libre de la chaîne est trop enfouie dans la molécule pour pouvoir être impliquée dans une liaison avec un autre monomère. Ce résultat est en apparente contradiction avec ce qui a été décrit dans la littérature (Y.-

H. Chou et al., 2014). Pour ces auteurs, AtFuT1 existe bien sous forme de dimères, mais liés de façon covalente. Cette observation a été faite à partir d'expériences de co-immunoprécipitation sur des formes cellulaires non tronquées. AtFuT1 présente une cystéine dans son domaine transmembranaire (Cys48) et donc on ne peut exclure l'existence dans l'appareil de Golgi d'un dimère covalent via la formation d'un pont disulfure intramembranaire. Ce type d'association a été démontré pour d'autres GTs eucaryotes (Kellokumpu, Hassinen, & Glumoff, 2015).

Un résultat surprenant a été observé au cours de la purification d'AtFuT1. Celle-ci migre en SDS-PAGE, avec des conditions dénaturantes, sous la forme de deux bandes distinctes de PM très proches (migration estimée à 53 et 59 kDa), correspondant cependant à la taille attendue du monomère. Des analyses complémentaires par MALDI-TOF et séquençage N-terminal a permis de montrer que la forme basse est une forme tronquée qui a perdu son tag N-terminal (séquence comprenant 35 acides aminés rajoutée à l'extrémité N-terminale de la construction AtFuT1<sub>Δ68</sub>). Il y aurait donc un clivage de cette étiquette, soit pendant sa maturation soit après son expression. Aucune protéase pouvant induire ce type de clivage (entre Gln-Ser) n'a pu être identifiée. Curieusement, ce monomère dépourvu de son étiquette (His)<sub>6</sub> est retenu sur colonne His-Trap. Ceci ne peut s'expliquer que par la formation d'un dimère entre une chaîne intacte (possédant son étiquette) et une chaîne clivée (sans étiquette). Il est à noter que la proportion de ces bandes est assez variable d'une production à l'autre, mais que celle de la construction intacte reste toujours majoritaire.

Les rendements exacts de la proportion d'AtFuT1 retenue sur la colonne IMAC n'ont pas été calculés. Des tests de transferts de GDP-[<sup>14</sup>C]-Fuc ont cependant montrés que l'activité fucosyltransférase est importante dans le filtrat d'injection. Ceci peut être dû au rendement intrinsèque de cette purification par affinité, mais aussi à l'impossibilité de fixer une partie des dimères : ceux dénués d'étiquette polyHis. Sachant désormais que l'étiquette servant à la fois à la détection et à la purification de la protéine est susceptible d'être clivée de la construction, il serait bienvenu de se doter à l'avenir d'anticorps spécifiques des séquences produites avec ce système d'expression. Cela permettrait de mieux comparer les différentes productions entre elles, ainsi que les rendements de purifications, les formes de la protéine obtenues, etc.

Par ailleurs, la séquence AtFuT1<sub>Δ68</sub> comprend deux sites potentiels de N- glycosylation (Asn88 et Asn504). Les résultats de séquençage N-terminal combinés à l'analyse par MALDI-TOF montrent que les deux sites de N-glycosylation sont occupés sur les deux espèces moléculaires. L'occupation de ces sites n'a pas pu être démontrée de façon claire dans la structure d'AtFuT1, car ces deux résidus Asn sont exposés dans le solvant. Les chaînes glycaniques sont alors bien trop flexibles pour pouvoir être modélisée. On peut toutefois raisonnablement affirmer qu'il s'agit de N-glycannes bi-antennés difucosylés sur le GlcNAc proximal.

Les mesures d'interaction par ITC suggèrent que l'enzyme nécessite à la fois le xyloglucane et le GDP pour se lier efficacement à l'un comme à l'autre. Ce résultat paraît plausible, puisque pour de nombreuses GTs la liaison au premier substrat induit les changements de conformation permettant de se lier au deuxième (Qasba, Ramakrishnan, & Boeggeman, 2005). En revanche, le GDP et le fragment XLLG liés à la protéine dans le cristal n'ont pas induit de changement de conformation significatif, par rapport à la structure de l'enzyme seule. Ces deux molécules se trouvent d'ailleurs à la surface de l'enzyme. Il est donc encore difficile d'identifier le mécanisme responsable de ces mesures d'affinité obtenues par ITC.

Le résultat concernant l'affinité et le taux de transfert de fucose vis-à-vis du fragment XLLG sont davantage concordant. La longueur de l'accepteur semble influencer l'affinité pour ce dernier : la constante de dissociation mesurée est environ quatre fois plus faible pour le xyloglucane (14  $\mu$ M) que pour un fragment composé de huit unités de glucose (64  $\mu$ M). Les tests préliminaires d'activité de sur de petits fragments semblent indiquer que seul 5 % de l'activité de AtFuT1 <sub>$\Delta$ 68</sub> est maintenu pour l'oligosaccharide XLLGXLLG, comparé au xyloglucane. En présence du plus petit fragment (XLLG), aucun transfert n'a été mesuré. Il y aurait donc une baisse à la fois d'affinité et d'activité vis-à-vis des oligosaccharides. Les premières observations de la structure suggèrent qu'une molécule de xyloglucane puisse se lier aux sites accepteurs de chacune des deux chaînes du dimère. Il est donc possible que la disposition de l'accepteur et/ou l'affinité soit améliorée par l'interaction d'un plus grand nombre de résidus de ce polysaccharide avec l'enzyme. Une modélisation de la chaîne de xyloglucane sur le dimère serait nécessaire pour conforter davantage cette hypothèse. Un maintien de la longue molécule de xyloglucane pourrait avoir un rôle dans le procédé de synthèse de l'ensemble du polymère, *in-vivo*. Au niveau expérimental, les expériences de trempage pourraient être réalisées avec l'oligosaccharide XLLGXLLG, dans l'objectif d'observer comment se positionne une séquence deux fois plus longue. Maintenant que la structure est résolue, il serait aussi possible d'analyser par RMN (résonance magnétique nucléaire) quels groupements interagissent avec les fragments utilisés, en solution. Surtout, des oligosaccharides de tailles légèrement supérieurs pourraient être employés.

Un autre objectif du doctorat a été de concevoir de nouveaux tests d'activité GT permettant (i) de cribler un grand nombre de conditions (variété de substrats donneurs et accepteurs, tampons,...) et (ii) d'aider à la caractérisation fonctionnelle des nombreuses GTs putatives identifiées chez *Arabidopsis thaliana* (Hansen et al., 2012). L'une des difficultés majeures concernant les GTs de fonction biochimique inconnue est en effet d'identifier avec précision leurs substrats donneur et accepteur. Dans un premier temps, je me suis inspiré d'un kit commercial (US biological) pour développer un test colorimétrique basé sur le dosage du Pi libéré dans le milieu réactionnel. En effet l'action d'une GT libère un NDP comme produit de réaction. Ce NDP est hydrolysé par une phosphatase et le Pi libéré est dosé par un réactif à base de molybdate d'ammonium

et de vert de malachite. Ce test est simple à mettre en oeuvre, peu coûteux, et adapté au format de microplaque. Son inconvénient est le fort bruit de fond que l'on peut rencontrer dès lors que l'on travaille sur des échantillons bruts ou partiellement purifiés. Ce type de test semble plus adapté pour un criblage « qualitatif », où l'on souhaite une réponse rapide de type OUI/NON ou -/+ /++.

Nous avons eu l'occasion de tester un nouveau type de dosage d'activité GT basé sur la bioluminescence (UDP-Glo™ Glycosyltransferase assay). Ce kit était commercialisé depuis peu par Promega pour les GTs utilisant un UDP-sucre. Nous avons été « pionniers » pour l'utilisation de ce kit sous sa forme GDP-Glo qui est adapté aux fucosyltransférases. Le GDP formé lors de la réaction est converti en ATP qui, sous l'action d'une luciférase, génère un signal bioluminescent qui est quantifié dans un luminomètre. Ce type de dosage s'est révélé très sensible, adapté au format de microplaque, et permet de déterminer avec précision les paramètres cinétiques de l'enzyme comme nous l'avons démontré avec AtFuT1. Il est *a priori* préférable de l'utiliser avec une enzyme purifiée. Cependant la large amplitude de mesure et la sensibilité de la méthode permettent d'envisager des mesures d'activité GT en surnageant de milieu de culture dialysé. Cette technique peut remplacer avantageusement les tests radioactifs qui sont encore très employés pour mesurer une activité GT. A travers ces deux types d'essais, nous avons souligné l'importance de disposer de source de nucléotide-sucres de très bonne qualité (ne présentant pas ou très peu de NDP ou Pi).

Avec une autre approche, nous avons cherché à utiliser à notre profit une bio-puce comprenant un grand nombre d'oligosaccharides purifiés à partir de polysaccharides pariétaux d'*Arabidopsis thaliana*. Cette bio-puce avait été préparée dans un autre contexte pour analyser, par imagerie SPR, l'interaction de protéines pariétales avec les ligands fixés. Nous avons envisagé d'utiliser cette biopuce pour l'identification d'accepteur de GT pariétales. L'objectif a donc été d'employer AtFuT1, dont la fonction est connue, comme preuve de concept. Parce que cette bio-puce contenait les accepteurs XXLG et XLLG, nous espérions obtenir un signal positif. Malgré plusieurs essais réalisés dans des conditions variables de tampon (avec ou sans SAB, Tween 20,...), différentes concentrations en enzyme, en présence de GDP ou non, nous n'avons pas réussi à obtenir un signal spécifique. Nous nous sommes heurtés en plus à des problèmes importants de fixation non spécifique des protéines. A la lumière de tous les résultats obtenus sur AtFuT1, l'une des explications possibles expliquant cet échec est la taille trop faible des sondes oligosaccharidiques XLLG et XXLG qui, fixées sur une surface, ne permettent pas un accès optimal au galactose accepteur. Par ailleurs, même si l'accepteur XLLG peut se fixer au site actif de l'enzyme, il ne semble pas un bon accepteur pour la réaction de transfert comme montré par les tests préliminaires d'activité. Même s'il n'a pas fonctionné pour AtFuT1, le concept de l'imagerie SPR reste intéressant et pourrait se révéler performant pour d'autres activités GTs. Il permet de tester un grand nombre de ligands fixés et la bio-puce est recyclable. La taille du linker

et la densité des plots seraient probablement à optimiser, si des études ultérieures sont menées.

L'un des résultats majeurs de ce doctorat a été la résolution de la structure cristallographique AtFuT1<sub>Δ68</sub>. Celle-ci a pu être résolue sous la forme apo-enzyme et en complexe avec le GDP et l'accepteur XLG, à des résolutions de 2.1 et 2.2 Å, respectivement. Il s'agit de la première structure dans la famille GT37 et de la première structure d'une GT impliquée dans la synthèse de polysaccharides pariétaux. AtFuT1 adopte un repliement de type GT-B formé de l'association de deux domaines distincts de taille comparables (appelés domaines N-ter et C-ter). Cependant un examen plus détaillé de la structure montre des différences notables avec le repliement classique de type GT-B décrit pour la première fois en 1994 pour une  $\beta$ -glucosyltransferase de phage de la famille GT63 (Vrielink, Rüger, Driessen, & Freemont, 1994). Les principales différences viennent du domaine N-ter qui ne se présente pas comme un véritable Rossmann et par l'absence des 2 longues hélices C-terminales stabilisant les deux domaines. A la place, AtFuT1 présente un domaine extra C-term formé de deux courts feuillets  $\beta$  antiparallèles (2  $\beta$ -hairpin) et stabilisé par 2 ponts disulfures.

Le site actif de l'enzyme se situe dans une poche à l'interface des deux domaines. La liaison au GDP implique très majoritairement des acides aminés du domaine C-ter (ce qui est classiquement observé chez les GTs de type GT-B). La position du XLG dans le site permet de comprendre pourquoi seul le Gal3 est accepteur. XLG est maintenu en place dans le site par des contacts essentiellement avec les résidus Xyl1 et Gal3 (cf nomenclature des résidus du motif XLG, [figure VI.9](#)). Ces contacts impliquent des résidus appartenant au domaine N-ter et au domaine extra C-term. AtFuT1 appartient à la famille des GTs agissant par inversion de la configuration anomérique (« inverting » enzymes). A ce titre, le mécanisme réactionnel présumé est une substitution nucléophile d'ordre 2 (S<sub>N</sub>2) au cours de laquelle un acide aminé (ex : Asp, Glu ou His) joue le rôle de base catalytique déprotonant l'accepteur, ce qui rend ce dernier nucléophile et lui permet d'attaquer le donneur (Lairson et al., 2008 ; Breton et al., 2012). Cependant, un mécanisme différent a été récemment proposé pour POFUT1. Pour cette enzyme, un mécanisme de type S<sub>N</sub>1-like, dans lequel la liaison glucidique serait clivée avant l'attaque nucléophile par l'accepteur, a été suggéré (Lira-Navarrete et al., 2011). Une arginine très conservée serait le résidu clé qui faciliterait le clivage de la liaison osidique. AtFuT1 appartient, tout comme POFUT1, à la superfamille des fucosyltransférases qui regroupent les familles GT23, GT37, GT65 et GT68 (Martinez-Duncker, 2003). L'équivalent Arg dans AtFuT1 serait Arg366. Concernant le mécanisme réactionnel d'AtFuT1, l'examen de son site actif suggère que les acides aminés potentiellement importants pour la catalyse sont : Ser180, Asn184, His271, Asp300 et Arg366. Des mutations ponctuelles sur chacun de ces résidus sont en cours avant de pouvoir se prononcer sur le type de mécanisme.

En plus de l'étude des mécanismes fondamentaux de fonction des GTs, plusieurs applications à des fins des recherches appliquées peuvent découler de la purification mise au point et des informations structurales obtenues. Notamment, l'analyse du site actif et des groupements impliqués dans le maintien des substrats pourraient servir de base pour des projets d'ingénierie enzymatique.

Typiquement, deux projets peuvent être suggérés : (i) une modification de la spécificité de l'enzyme pour lui permettre d'accommoder un nouveau type d'accepteur, ou (ii) l'ajout d'une fonction chimique sur un atome du groupement fucose de la molécules GDP-fuc, de manière à fonctionnaliser les motifs XXLG et XLLG.

L'équipe « physicochimie et auto-assemblage des glycopolymères » du laboratoire étudie les propriétés physico-chimiques en solution ou à l'état solide de xyloglucane (XG) modifiés chimiquement ou enzymatiquement. Cette équipe s'intéresse particulièrement à la formation de nanogels pour des applications médicales ou cosmétiques. Par le contrôle de la modification structurale de XG, il est possible de réaliser une étude fine des relations structures/propriétés. Pour cela, il est important de développer des outils chimio-enzymatiques efficaces, permettant d'accéder à des structures parfaitement définies. La présence d'une fonction azoture sur le fucose des fragments XLFG et XXFG pourrait permettre d'effectuer de la chimie « click », c'est à dire des réactions très spécifiques avec un alcyne. Cela étendrait la gamme de molécules dérivées de xyloglucane, et ainsi les possibilités de matrices pour effectuer différents types de matériaux polysaccharidiques à haute valeur ajoutée et issus de la biomasse végétale non-alimentaire. La valorisation des oligosaccharides XLFG et XXFG est aussi d'un intérêt certain, puisqu'ils pourraient permettre à cette équipe de reconstruire des mimes de XyG par le biais de la synthèse de glycopolymères. Des modifications sur des oligosaccharides issus de xyloglucane ont déjà été effectuées par ce type de voies chimique, de manière à les lier à des peptides ou à de la cellulose (Araújo et al., 2012 ; Xu, Spadiut, Araújo, Nakhai, & Brumer, 2012). Dans ce contexte, la structure d'AtFuT1 pourrait servir à déterminer la meilleure position pour fixer le groupement d'intérêt sur le fucose du donneur GDP-Fuc, sans gêner la position de ce résidu dans le site actif. L'enzyme serait alors utilisée pour ajouter le fucose modifié sur la chaîne de xyloglucane, préalablement à sa digestion.

Un autre projet pourrait consister à modifier le site accepteur d'AtFuT1 de manière à accommoder un accepteur à potentiel thérapeutique. Un projet similaire a été effectué avec FUT8 et un chitooligosaccharide (cf [introduction : ingénierie de glycosyltransférases](#)). Pour rappel, cette classe de molécules possède de nombreuses propriétés antitumorales, antioxydantes, et antihypertenseur (Aam et al., 2010 ; Je & Kim, 2012 ; Kim et al., 2012). NodI est constitué d'une chaîne principale de GlcNAc. Il est fucosylé sur le dernier groupement, par la fucosyltransférase bactérienne NodZ, dont la structure est l'une des plus similaires à AtFuT1. Ihara et al (2013) ont réussi à faire un

ajouter un second fucose sur Nod par FUT8, la fucosyltransférase de mammifère dont la structure est proche de celles de NodZ et AtFuT1. Bien que le résidu accepteur « naturel » de Fut8 soit aussi un GlcNAc, ce qui n'est pas le cas pour AtFuT1, cet accepteur est globalement très différent de la molécule « naturelle ». Par ailleurs, aucune ingénierie de l'enzyme n'a été nécessaire. Le chitooligosaccharide di-fucosylé s'est révélé plus résistant à différentes glycosydases et en conséquence davantage « biodisponible ». Il serait donc imaginable d'exploiter AtFuT1 en vue d'obtenir un chitooligosaccharide tri-fucosylé avec de nouvelles propriétés. Les structures des trois enzymes (NodZ, FUT8, AtFuT1) pourraient servir de base pour déterminer des acides aminés candidats à muter, afin de modifier l'accepteur de d'AtFuT1. Des projets similaires ont déjà été effectués avec d'autres GTs (Brazier-Hicks et al., 2007 ; Williams et al., 2007 ; Gantt et al., 2008 ; Ollis, Zhang, Fisher, & DeLisa, 2014). Dans un premier temps, une modélisation appropriée permettrait d'évaluer la faisabilité de ces deux projets. À court terme, l'enzyme AtFuT1 purifiée pourra déjà servir au laboratoire à fournir du xyloglycane fucosylé à l'équipe « étude des glycomatériaux ». Une partie des travaux de cette équipe vise à élucider le rôle de chacun des composants dans le comportement mécanique de la paroi végétale. Ils disposent pour cela d'un modèle physico-chimique de cette dernière : des capsules biomimétiques, dont l'architecture est composée de cellulose et xyloglucane. Le xyloglucane fucosylé pourrait notamment être intégré à ces assemblages, de manière à évaluer l'effet de cette molécule sur la résistance mécanique du modèle face à une pression de turgescence.

Enfin, différentes méthodes et procédures ont été mises places durant ce doctorat pour répondre aux besoins de l'étude : c'est le cas notamment de la culture des cellules en suspension, de la préparation du milieu à purifier et du criblage d'activité, peu onéreux, à base de malachite. Du matériel commercial innovant a été employé, tels que les nouvelles colonnes IMAC et le test d'activité GDP-Glo. L'efficacité et l'apport de toutes ces techniques se sont démontrés par la réussite du projet. Les protocoles et le retour d'expérience, dont bénéficie le laboratoire, pourront désormais servir à la caractérisation de nombreuses autres glycosyltransférases.

---

## **Chapitre VIII : Matériel et Méthode**

---



## VIII. Matériels et Méthodes

### VIII.1. Clonage et tests de production de protéines en bactéries

Deux séquences : AtFuT1 $\Delta_{68}$  et AtFuT1 $\Delta_{93}$  ont été amplifiées par PCR à partir du plasmide pVT-Bac-His\_AtFuT1 $\Delta_{68}$  et clonées dans différents plasmides bactériens. La majorité des plasmides utilisés induisent l'expression de la protéine d'intérêt suite à l'ajout d'IPTG dans le milieu de culture. Les paragraphes suivants présentent brièvement le principe du système ainsi que la méthode employée.

#### ➤ Principe de l'induction par IPTG avec les plasmides pET

Les plasmides pET s'utilisent en combinaison avec une souche de bactéries (DE3) contenant le gène d'une polymérase virale : l'ARN polymérase T7, codée sur le chromosome (Figure VIII.1). La transcription de cette ARN polymérase est sous le contrôle du promoteur et de l'opérateur lactose.

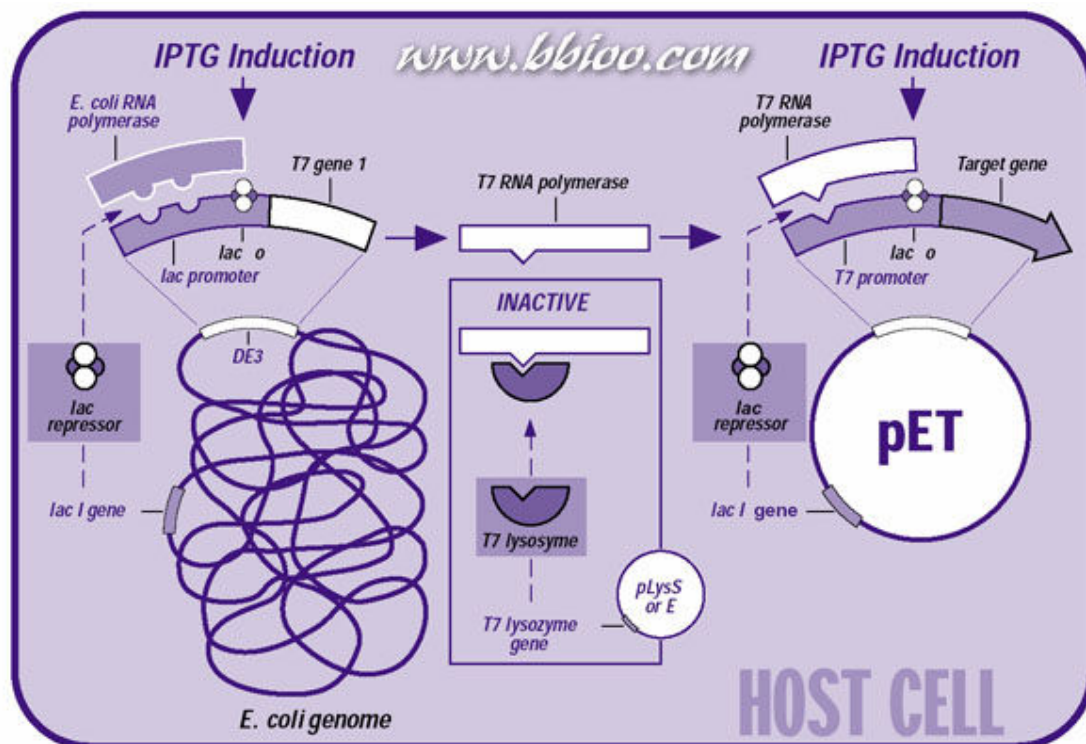


Figure VIII.1 : Illustration du système d'induction à l'IPTG utilisé avec les souches *E. coli* DE3 et les plasmides pET.

Les souches utilisées (DE3) possèdent le gène codant pour l'ARN polymérase T7, sous le contrôle de l'opérateur *lacO* de l'opéron lactose (à gauche sur la figure). La présence de l'IPTG lève la répression induite

sur les opérateurs lactose : sur l'ADN génomique et plasmidique. La polymérase T7 est alors exprimée. Celle-ci se fixe sur son promoteur T7 présent sur le plasmide et transcrit les gènes d'intérêts situés en aval.

Cet opérateur, à l'état stable, est lié à un répresseur de transcription : la protéine LacI codée à la fois sur le génome de la bactérie et sur le plasmide. LacI se lie au sillon majeur de l'opérateur lactose. Cette liaison augmente l'affinité spécifique de l'ARN pour son promoteur, à tel point qu'elle ne peut plus s'en échapper pour entrer dans la phase d'élongation. La présence de lactose ou d'un analogue du lactose comme de l'IPTG change la conformation de LacI et supprime sa liaison avec l'opérateur. La transcription du gène en aval de l'opérateur Lac s'effectue alors correctement et l'ARN polymérase virale codée sur le génome bactérien est produite. Cette dernière reconnaît spécifiquement le promoteur viral T7 et transcrit très fortement les gènes placés sous son contrôle.

## ➤ Clonages des inserts en plasmides bactériens

### • Méthode de clonage des inserts

Les séquences correspondant aux troncations AtFuT1<sub>Δ68</sub> et AtFuT1<sub>Δ93</sub> ont été amplifiées par PCR, à partir du plasmide pVT-Bac-His. Les produits PCR sont d'abord déposés et migrés en gel d'agarose pour contrôler leur taille et les purifier du mélange de réaction. Les bandes qui correspondent aux tailles d'intérêts sont alors découpées et solubilisées. Enfin, les amplicons sont repris en eau, pour pouvoir ensuite faire agir les enzymes de digestion avec le tampon approprié. Le plasmide accepteur est produit en bactérie puis extrait par « minipréparation » ou « miniprep ». Ce procédé consiste à lyser les bactéries et à séparer l'ADN plasmidique de d'ADN génomique et des protéines. Les plasmides obtenus sont linéarisés par les enzymes de restriction d'intérêt et purifiés par une migration en gel d'agarose. La ligation s'effectue ensuite avec une concentration molaire d'inserts environ trois fois plus élevées que celle de plasmides. Quelques microlitres de cette réaction de ligation sont alors utilisés pour transformer des bactéries TOP10. Ces bactéries transformées sont étalées sur un milieu LB (*lysogeny broth*) gélosé, contenant l'antibiotique dont la résistance est conférée à la bactérie par le plasmide. Certains clones sont sélectionnés pour vérifier la présence de l'insert par PCR puis par digestion du plasmide, préalablement à un envoi au séquençage. Ensuite, ces préparations de plasmides sont utilisées pour transformer les souches utilisées pour l'expression de protéines.

### • Amplification de séquences par polymérisation en chaîne (PCR)

Les séquences d'intérêt ont été amplifiées à partir de l'ADNc (complémentaire) d'AtFuT1 issu de la base de donnée génétique TAIR (*The Arabidopsis Information Resource*) et cloné dans le plasmide pENTR. Le mélange réactionnel : oligonucléotides (10 µM chacun), polymérase (Hot start, Qiagen - 2,5 unité pour 50 µL final) ADN

plasmidique (50 ng/μL) ont été soumis aux variations de températures du thermocycleur *Master Cycle gradient*, (Eppendorf). Le programme employé est celui recommandé par le fournisseur, avec une température d'hybridation de 56°C pour les 5 premiers cycles et de 60°C pour les 24 suivants. L'élongation est réalisée à 72°C pendant une minute et quarante secondes. Une étape d'extension est ajoutée à la fin des cycles : 10 min à 72°C. La nature des amorces oligonucléotidiques est détaillée ci-dessous, pour chaque insert dans chaque vecteur.

- **Clonage d'AtFuT1 dans le plasmide pET-TEV**

Le vecteur pET-TEV est issu du plasmide commercial pET28 (Novagen). Le site de clivage de la thrombine et le tag T7 ont été supprimés. Le site de clivage de la protéase TEV a été ajouté, pour retirer l'étiquette His-tag située en partie N-terminale de l'insert. Une deuxième étiquette his-tag se trouve en aval du site de clonage, mais les troncations d'AtFuT1 ont été insérées avec leurs codons stop.

Les couples d'amorces utilisées pour amplifier les séquences tronquées d'AtFuT1 par PCR sont : NdeI-AtFuT1-68 (sens) ATATATCCATATGTCAAATCGGATTATGGGTTTCG et EcoRI-AtFuT1 (antisens) GGGGACTTAAGCTAGTATGAGAATTCGG pour AtFuT1<sub>Δ68</sub> ; et NdeI-AtFuT1-93 (sens) ATATATCCATATGTCTGATAAGCTTCTCGGAGGGC et EcoRI-AtFuT1 (antisens) pour AtFuT1<sub>Δ93</sub>. Ces amorces comportent les sites de clonages EcoRI et de NdeI (en jaune et cyan respectivement) utilisées pour l'insertion dans le plasmide.

- **Clonage dans les plasmides pET-32-TEV**

Ces deux plasmides ne comportent pas le site de clonage NdeI utilisé avec pET-TEV. Les amorces commandées pour inclure NcoI dans le cadre de lecture sont (sens 5' -> 3') : NcoI-FuT1-68 TATCCCATGGCA TCAAATCGGATTATGGGTTTCG et NcoI-FuT1-93 TATCCCATGGCATCTGATAAGCTTCTCGGAG. Le site NcoI est surligné en cyan et les deux nucléotides ajoutés pour rester dans le cadre de lecture en vert.

- **Clonage dans les plasmides pBADM-41+ et pMALp2-TEV**

Les inserts AtFuT1<sub>Δ68</sub> et AtFuT1<sub>Δ93</sub> ont été extraits par digestion à partir du plasmide pET-32-TEV par l'utilisation des enzymes NcoI et EcoRI, puis ligués dans les plasmides d'intérêts.

- **Transformation des bactéries**

L'ADN plasmidique contenant la construction d'intérêt est inséré dans des bactéries compétentes par un choc thermique : 1 ng de plasmide est mélangé à 50 μl de bactéries compétentes. Après 30 mn d'incubation dans la glace, le mélange est placé à 45 sec à 42°C. Après une seconde incubation de 2 min dans la glace, les cellules sont incubées dans 1 ml de milieu LB pendant 45 min à 37°C, sous agitation (200 tpm). Les cellules

sont ensuite étalées sur du milieu LB contenant l'antibiotique (1mM) nécessaire à la sélection.

- **Test d'expression de protéine en bactérie**

La production de la protéine est induite entre le début et le milieu de la phase exponentielle de croissance, estimée par une mesure de la densité optique du milieu. Cette induction est réalisée par l'ajout d'une molécule exogène : de l'IPTG ou de l'arabinose, selon le promoteur du plasmide. Une fois la phase d'induction terminée, les bactéries sont centrifugées à 8000xg, reprises en tampon (1/25 ième du volume de culture) et broyées dans un désintegrateur de cellules (CellD) à 1,9 Kbar. Le lysa bactérien est alors centrifugé à nouveau, plus rapidement (50 000xg). Cette deuxième centrifugation sépare les fragments de cellules et les agrégats de protéines mal repliées (dont les corps d'inclusions), des particules solubles qui restent en suspension.

## **VIII.2. Clonage et expression de protéines avec le système baculovirus/cellules d'insectes**

### **➤ Principe de la technique**

Le système baculovirus/cellule d'insecte repose sur l'exploitation d'un virus spécifique des larves de certains insectes : « Autographa californica nuclear polyhedrosis » (baculovirus AcNPV) dans lequel est insérée la construction génétique d'intérêt.

Ce virus, optimisé pour la production de protéines en laboratoire, est trop large pour être manipulé aisément. D'où l'utilisation d'un vecteur de transfert : un plasmide dont la propriété est de pouvoir être multiplié en bactéries et transfecté en cellules d'insecte. Ce dernier permet alors la recombinaison de la construction génétique dans le génome du virus. Différent fournisseurs et laboratoires commercialisent à la fois le virus et une batterie de plasmides navette, à choisir en fonction de l'application souhaitée (sécrétion de la protéine, ajout d'étiquette N- ou C-ter,...). Notre laboratoire utilise jusqu'à présent le virus baculogold (PharMingen) en combinaison avec un plasmide transmit et modifié de laboratoire en laboratoire : pVT-Bac-His. Les éléments caractéristiques de ce plasmide, ainsi que les étapes de clonage et de recombinaison dans le virus baculogold sont brièvement résumées et illustrées ci-après.

pVT-Bac-His est dérivé de pVT-Bac, lui même issu de pAc373, l'un des premiers créés pour ce système d'expression (Smith et al., 1985 ; Smith, Summers, & Fraser, 1983). Ce plasmide comporte les éléments génétiques classiquement utilisés pour la production de protéines recombinantes en cellules d'insecte : un promoteur fort du virus, un peptide signal, des étiquettes clivables et un site multiple de clonage.

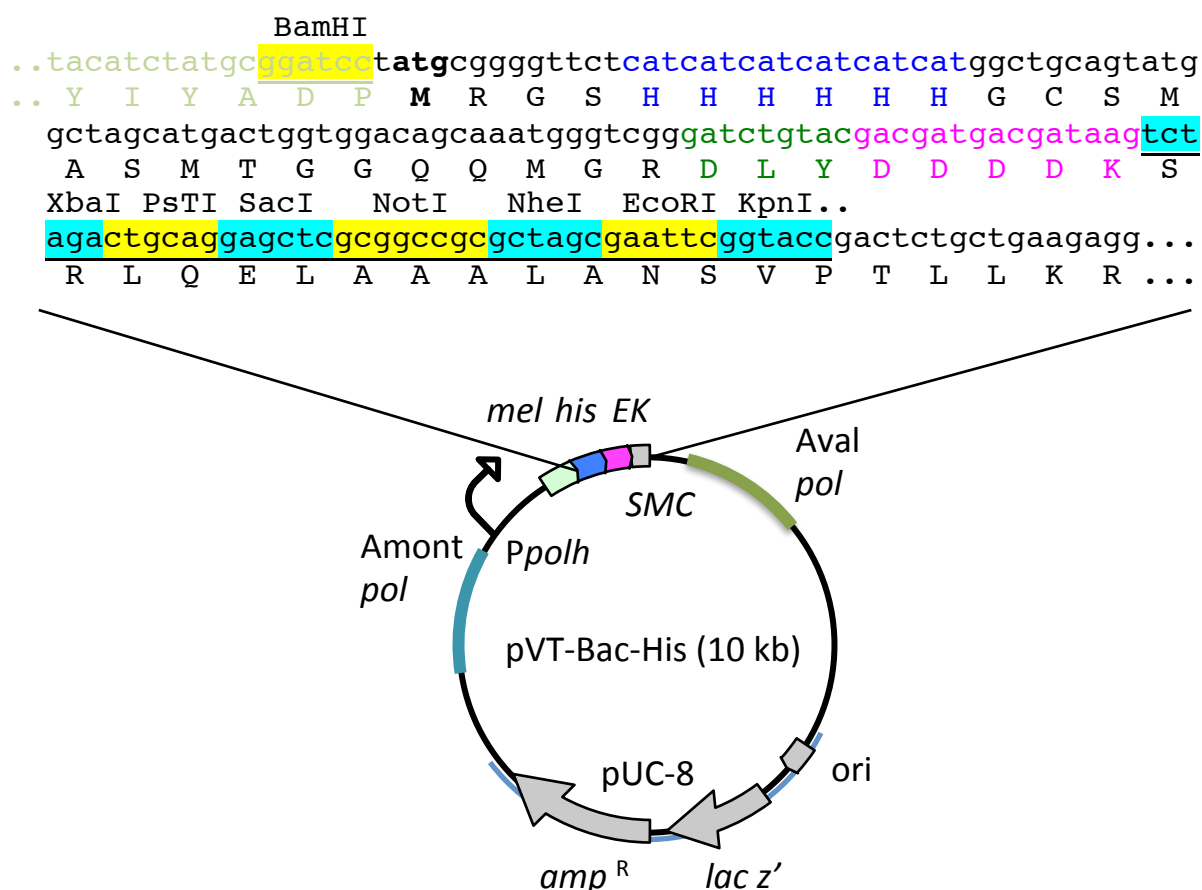


Figure VIII.2 : Vecteur de transfert pVT-Bac-His utilisé pour le clonage d'AtFuT1.

Ce plasmide comporte des séquences homologues à celles situées en amont et en aval du gène de la polyhédrine, permettant sa recombinaison dans le génome du baculovirus AcNPV. Le promoteur de la polyhédrine (Ppolh) est un promoteur fort et tardif du virus, permettant d'obtenir le plus de protéines. La séquence représentant le peptide signal de la méliittine est en vert clair, celle de l'étiquette histidine en bleu et le site de l'entérokinase en magenta. Des anticorps commerciaux peuvent être utilisés pour reconnaître les séquences poly His ou X-Press (DLYDDDDK). Les sites de clonages sont soulignés en noir et surlignés alternativement en jaune et cyan. Les enzymes correspondantes sont indiquées au dessus. Les motifs en bas en gris correspondent aux éléments nécessaires à la sélection, répliation et au criblage de la présence du plasmide en bactérie.

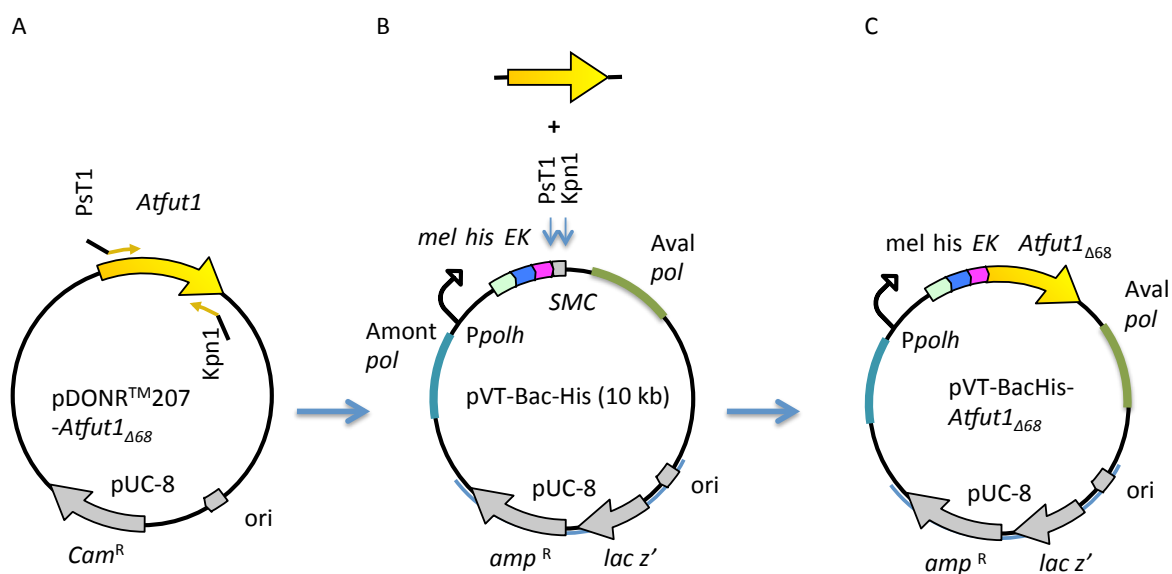
Les éléments composant ce plasmide permettent d'optimiser la sécrétion de la protéine recombinante et de faciliter à la fois sa purification et son identification.

- Le promoteur (Ppolh) est celui de la polyhédrine, une protéine très fortement exprimée lors des étapes tardives de l'infection d'une cellule. L'utilisation de ce promoteur permet d'atteindre des taux d'expression importants (Smith et al., 1985).
- la séquence du peptide signal (PS) de la méliittine induit la translocation de la protéine nouvellement formée à travers le réticulum endoplasmique, première étape du chemin sécrétoire. Ce PS provient de la méliittine : la toxine du venin d'abeille *Apis mellifica*, une protéine fortement exprimée (Mollay, Vilas, & Kreil,

1982). Parmi les deux PS testés, c'était celui qui avait permis d'obtenir le plus de protéines rapportrices (Tessier, Thomas, Khouri, Laliberté, & Vernet, 1991).

- Deux séquences en aval du peptide signal facilitent la purification et la détection des protéines sécrétées. L'une code pour une étiquette polyhistidinne (6 his) utilisée pour les purifications par affinité au nickel. La suivante (GLYDDDDK) permet d'être détectée par les anticorps anti X-press lors d'immunoblots, et comporte le site d'action d'une entérokinase (EK) : (DDDDK). Cette dernière peut servir à retirer l'ensemble de l'étiquette une fois la protéine purifiée.

Le clonage d'AtFuT1 dans ce plasmide, effectué préalablement au début de ce doctorat, est représenté [figure VIII.3](#).



**Figure VIII.3 : Clonage d'une portion d'AtFuT1 dans le vecteur pVT-Bac-His. Exemple avec AtFuT1<sub>Δ68</sub>.**

A) La séquence désirée est amplifiée par PCR à partir d'un plasmide contenant l'intégralité de l'ADN « codant ». Ici, l'amorce du brin 5' s'apparie jusqu'au codon correspondant codant pour le 69ième acide aminé. Tandis qu'en 3' l'amorce touche la fin de la séquence. Les sites de restriction ajoutés sur chacune des amorces (Pst1 Kpn1) ne s'apparient pas à la séquence d'intérêt lors des premiers cycles.

B) Ils servent par la suite à digérer, puis liguer les amplicons PCR dans le vecteur d'intérêt.

C) Le plasmide pVT-Bac-His contenant l'insert peut alors être multiplié en bactérie et utilisée pour transfecter les cellules d'insecte.

Les séquences flanquantes du gène polh, en amont de ce promoteur et en aval des sites de clonage servent à recombinaison la partie du plasmide contenant la construction génétique dans le génome du virus ([Figure VIII.4](#)). Pour ce faire, les cellules d'insectes sont co-transfectées avec le plasmide et le baculovirus.

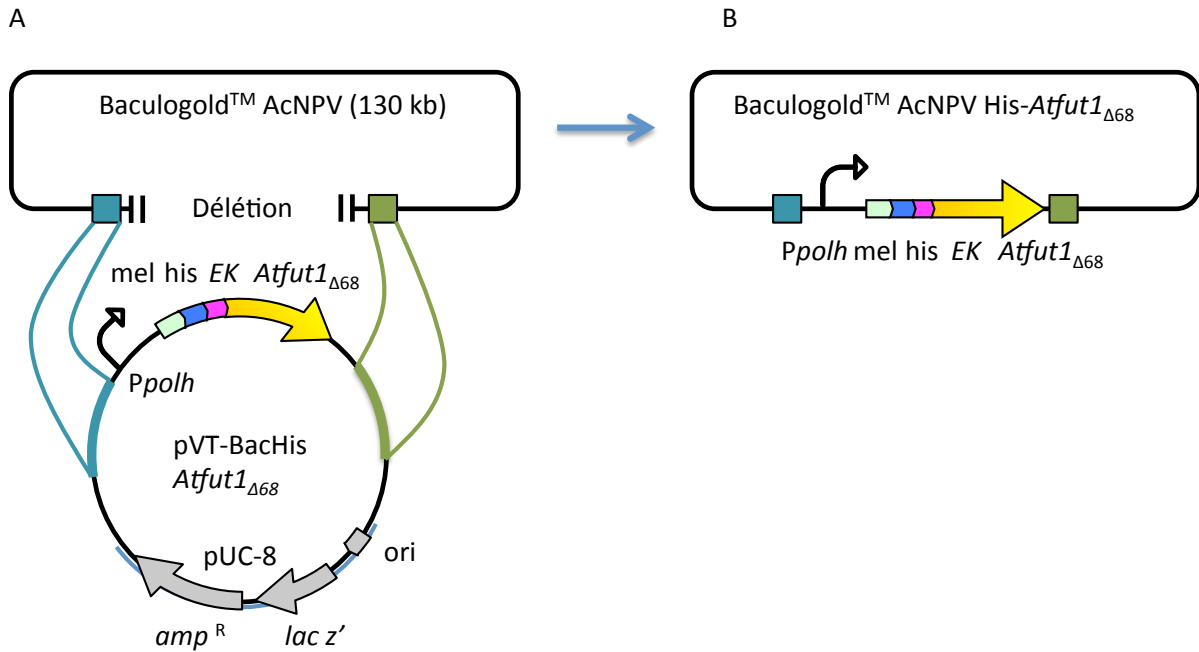


Figure VIII.4 : Recombinaison du plasmide vecteur pVT-Bac-His dans le génome de baculogold

A) Le virus seul n'a pas la capacité de se propager. Dans le cas de baculogold, ce dernier est fourni « linéarisé ». Des sites homologues sur le plasmide et le génome du virus permettent la recombinaison de la séquence d'intérêt.

B) La recombinaison circularise le virus et restaure sa viabilité. Cette séquence d'intérêt se trouve dans l'ADN du virus, alors capable de se multiplier et d'infecter les cellules.

La recombinaison du plasmide dans l'ADN du virus restaure sa viabilité. Ainsi, seules les particules virales contenant la construction peuvent se multiplier et infecter les cellules. Leur machinerie de synthèse de protéine se trouve alors détournée par le virus, qui exprime principalement la construction d'intérêt (Figure VIII.5).

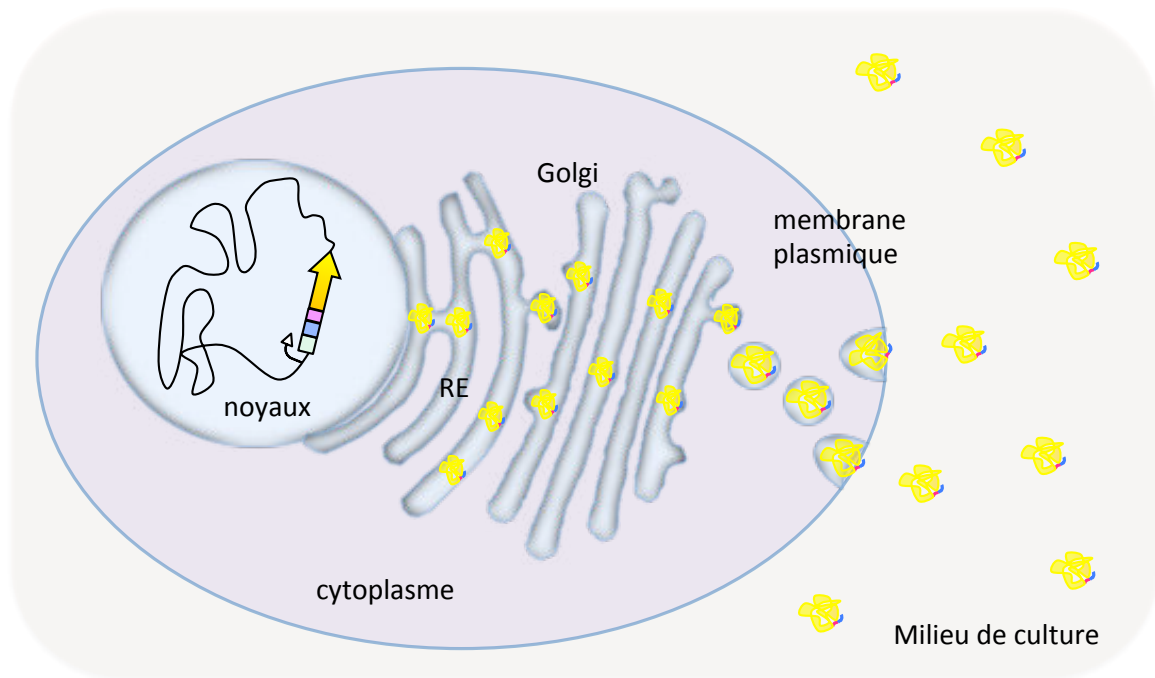


Figure VIII.5 : Expression de la construction His - AtFuT1<sub>Δ68</sub> en cellule d'insecte.

Le peptide signal de la mélittine (en vert) induit le passage de la construction à travers le chemin sécrétoire de la cellule d'insecte (RE = réticulum endoplasmique) et sa sécrétion. Ces compartiments comportent les batteries d'enzymes et les conditions nécessaires aux modifications post-traductionnelles eucaryotes.

Une fois la période d'infection terminée, les protéines sont purifiées à partir du milieu de culture débarrassé des cellules, appelé « surnageant ».

## ➤ Fabrication du virus et production de protéines

### • Culture en suspension

La lignée de cellules employées est *Trichoplusia ni* (High-five™ Invitrogene), cultivée en milieu Ex-Cell 405 (20ml) dans un erlenmeyer (erlen) de 100 ml. Le récipient est disposé sur le plateau d'un agitateur secoueur (type LS30, Gerhardt) à 130 tpm (tours par minutes) dans une pièce dédiée à la culture cellulaire. La température de la climatisation est réglée à 16°C, ce qui induit une température de 18°C dans le flacon. Les cellules sont diluées à une concentration de 0,4 million de cellules par millilitre (Mc/ml) le mardi pour être récupérées le vendredi, et à 0,3 le vendredi pour être récupérées le mardi. Le milieu, stocké à 4°C, est amené à la température de la pièce avant son utilisation et complété d'un antibiotique : 50 µg / ml de Gentamicine (Sigma). Le même erlen est utilisé pendant plusieurs « passages » jusqu'à ce que l'anneau de cellules qui se dépose sur le verre devienne important, soit environ deux semaines.

### • Comptage des cellules

Le comptage des cellules se fait par microscope (x100) sur une plaque de malasse. Le milieu de culture (25µl) est dilué au quart dans du PBS (65µl) et du bleu de trypan (10

μl). Ce colorant permet d'identifier les cellules dont la membrane est altérée, c'est à dire mortes ou infectées. Cela permet de suivre la proportion de cellules viables dans le cadre d'une population en maintien ou en amplification. Pendant une infection, cette technique ne permet pas de savoir clairement si les cellules colorées sont infectées par le virus ou si elles meurent, par exemple du fait d'une agitation trop forte ou d'un manque d'oxygène.

- **Infection des cellules en suspension**

Les cellules destinées à être infectées sont séparées de celles en maintien au moment d'un passage. Si l'objectif est d'infecter une quantité importante de cellules, les dilutions se font successivement dans des erlens de tailles supérieures. L'ordre de grandeur à respecter pour le récipient est un volume équivalent à quatre ou cinq fois celui du milieu. Durant ces étapes, le taux de mortalité doit rester inférieur à 5 %. La concentration à atteindre avant la dernière dilution est de 1 à 3 million de cellules par millilitre (Mc/ml). Celles-ci sont alors diluées à 0,5 – 1,5 Mc/ml avec au minimum 50 % de milieu neuf, puis infectées à une MOI de 3 (1 à 3 selon la quantité de virus disponible). Le récipient est alors placé à 27°C dans un incubateur agitateur (infors HT minitron) à la vitesse adaptée en fonction de la taille du récipient ([Cf Chapitre II](#)). La proportion de cellules mortes ou infectées est suivie à J2 et à J4, juste avant la récolte. En moyenne, 80 – 90 % des cellules doivent alors apparaître bleues à la coloration au bleu de trypan et toutes doivent avoir un volume supérieur aux cellules non infectées (en comparaison avec les cellules en maintien).

- **Préparation de la verrerie**

Les cellules cultivées en suspension sont maintenues ou amplifiées dans des erlens à fond lisse, entre 100 ml et 6 L. Après chaque utilisation le récipient est nettoyé à la brosse, en s'assurant d'enlever l'anneau de cellules restant sur le verre. La solution utilisée alors est de l'acide acétique 10 % en eau. Après plusieurs rinçages à l'eau chaude puis distillée, l'erien est autoclavé (20 min – 120°C) avec un volume d'eau distillée supérieur à 1/4 du récipient. Il est ensuite séché et pourvu d'un bouchon, réalisé par une feuille d'aluminium pliée en quatre, puis stérilisé à sec (2h – 160°C). Un film de paraffine est ajouté à la sortie du four pour maintenir l'aluminium sur le verre, puis la date de la stérilisation est notée sur le récipient, conservé si possible dans un espace clos (placard). En cas de non utilisation pendant un mois, une nouvelle stérilisation à sec est effectuée. Les bouteilles utilisées pour contenir du milieu sont préparées de manière similaire, préalablement à leur première utilisation : autoclavage avec de l'eau distillée, séchage, puis stérilisation avec le bouchon, par autoclavage. Lors des utilisations suivantes, la bouteille est simplement rincée avec de l'eau (chaude puis distillée), séchée et autoclavée. L'autoclave en présence d'eau distillée est une étape importante : elle

désorbe de la paroi du verre les molécules de produits précédemment utilisés pour le lavage des flacons.

- **Préparation du milieu de culture**

Les milieux de culture Grâce (Invitrogen), Express-five SFM (Invitrogen) et High-five (Sigma) utilisés pour le maintien des cellules ou pour des infections de petits volumes (5-200 ml) sont tous conditionnés en bouteilles de 0,5 ou 1 L. Pour des volumes de cellules destinées à être infectées supérieurs à 500 ml, le milieu Ex-Cell 405 utilisé est reconstitué à partir de poudre. Le protocole adapté est mis à disposition par le fournisseur (Sigma). Ce milieu n'étant pas autoclavable, il est stérilisé par filtration. Pour cela, des unités de filtration stériles en polyethersulphone (PES) aux pores de 0,22 µm sont utilisés (Bottle-top filters, Sartolab BT, Sartorius). Ces filtres sont vissés à une bouteille stérile et spécialement dédiée, sous PSM. Elles sont alors rincées à l'eau (chaude puis distillée), séchées et conservées pour filtrer du surnageant de milieu de culture, préalablement à la purification par IMAC.

- **Production du stock initiale de virus**

La lignée employée est *Spodoptera frugiperda* (SF9, Invitrogen). La transformation est effectuée avec les tampons et protocoles du fournisseur (Pharmlingen BD Dickinson). En bref, environ  $4 \times 10^4$  cellules sont placées à adhérer avec 100 µl de milieu (plaque 96 puits à fond plat). Le milieu est ensuite remplacé par 16 µl d'un tampon perméabilisant les membranes. L'ADN linéaire du virus (7 ng, Baculogold) est mélangé au vecteur de transfert (30 ng de plasmide pVT-Bac-His-AtFuT1<sub>68</sub>) puis mis au contact des cellules. L'incubation dure 72h à 27°C. Suite à cette transfection, trois infections en chaîne sont réalisées en triplant à chaque fois le nombre de cellules infectées. Une fois atteint le nombre de 9 millions de cellules avec 12 ml de milieu, le virus présent dans le surnageant est titré, de manière à connaître la concentration en particules infectieuses (pfu, plaque forming unit). La valeur obtenue en moyenne est de l'ordre de  $10^8$  pfu/ml.

- **Production de virus en cellule adhérente**

La lignée de cellule utilisée est *Spodoptera frugiperda* (SF9, Invitrogen). La culture se fait en milieu Grâce, avec 50 µg / ml de Gentamicine (Sigma). Les cellules sont infectées à une MOI de 0,1 (0,1 pfu/ cellule) environ pendant un temps d'incubation de 4 jours. Le surnageant de ce milieu de culture, contenant le virus recombinant, est récupéré par centrifugation des cellules infectées (8000xg – 10 mn) puis stocké à 4°C.

- **Titration du virus**

La méthode employée consiste à infecter des puits de cellules, en plaque 96 puits, par des dilutions en série du stock viral nouvellement produit. 10 répliques sont effectués par

niveau de dilution. On observe au bout de sept jours la limite à laquelle apparaissent des points d'infections et le nombre de puits infectés pour chaque niveau de dilution. Le titre est alors déterminé par une méthode statistique (Reed and Muench, 1938 ; (Radford et al., 1997). Cela permet d'avoir un ordre de grandeur de la charge virale utilisée pour chaque infection, et de comparer les stocks de virus entre eux.

- **Expression de protéine en cellules adhérentes**

La lignée de cellule utilisée est *Trichoplusia ni* (High-five™ Invitrogene). Ces cellules sont cultivées dans le milieu Express-Five ou Ex-Cell 405. Elles sont ensemencées à une confluence de 70 % et laissées à adhérer pendant 30 min au plastique de boîte avant d'ajouter le virus. La MOI (*Multiplicity Of Infection*) employée est typiquement de 5 pfu/cellule avec un temps d'infection de 4 jours à 27°C. Le surnageant est séparé des cellules par centrifugation et directement utilisé pour une purification, ou stocké à -70°C. Lors des premiers essais de production, une immunodétection de la protéine recombinante est généralement effectuée pour estimer le temps d'infection idéal.

- **Mini purification en batch**

L'expression de la protéine dans le milieu de culture de cellule d'insecte est contrôlée par une mini-purification en *batch* : 1 – 2 ml de surnageant sont traités avec 25 – 50 µl d'une résine Ni-agarose commerciale (type « cOmplete His-Tag », Roche). Les échantillons sont placés à 4°C pendant deux heures, agités par un petit aimant pour maintenir la résine en suspension, au contact de la protéine. Cette résine est ensuite récupérée par centrifugation (2 min à 6000xg) et lavée deux fois, dans un tampon identifié comme favorable pour AtFuT1 (HEPES 25 mM ; 150 mM NaCl ; pH7,4). Le deuxième lavage comporte 50 mM d'imidazole pour améliorer la pureté de la protéine. La résine est alors reprise dans 40 – 80 µl d'un tampon de charge dénaturant et réducteur. Les échantillons sont bouillis à 95°C pendant 7 min, centrifugés, puis le surnageant est analysé par SDS-PAGE et Western-Blot.

- **Essais de production de sélénoprotéines**

Deux milieux SF900II (Thermo Fisher) disponibles sous forme liquide ont été utilisés : l'un avec cystéine et méthionine pour la culture et l'amplification des cellules, puis l'un déplété de ces deux acides aminés après infection, pendant la production de la protéine. Pour compléter le milieu déplété, 50 mg de cystéine et 50 mg de sélénométhionine ont été dissouts à partir de poudre dans 10 ml de ce même milieu (soit 50X), puis filtrés à 0,2 µm. L'ajout de ces constituants a été effectué au moment de l'utilisation du milieu déplété. L'infection est effectuée à 1,6 millions de cellules par millilitre dans 800 ml, à une MOI de 6. La mortalité des cellules est alors inférieure à 1 % et aucun agrégat n'est observable. Les cellules sont centrifugées 10 h après l'ajout du virus à 1000 G et re-suspendues en milieu sélénié. La récolte est effectuée à trois jours post-infection. Le pH

surnageant de culture a été ajusté à un pH de 7,1, et la purification effectuée avec les conditions mises aux points.

## VIII.3. Techniques de biochimie

- **Préparation du surnageant de milieu pour la purification IMAC**

Le surnageant de milieu de culture de cellules High-Five est décongelé puis centrifugé à la vitesse maximale utilisable avec le matériel à disposition. Les conditions ont été de 8000xg pendant 15 mn avec des godets de 250 ml, et de 13000xg pendant 30 min avec des godets d'1L remplis à 80 – 90 %. Centrifuger à la vitesse maximale permet de se débarrasser du maximum de débris cellulaires et de faciliter l'étape de filtration. Le surnageant récupéré est placé dans une bouteille (ou dans un bécher de deux litres) avec un barreau aimanté, sur un agitateur magnétique. Le pH initialement de 6,1 est ajusté graduellement (par paliers de 0,1 – 0,2) à une valeur de 7,1. Le surnageant est alors filtré à 0,2 µm en ré-utilisant des unités de filtration jetables Sartolab, employées pour la stérilisation du milieu. Ce matériel est le seul identifié qui ne fasse pas mousser le milieu en passant à travers la membrane. L'échantillon est alors dégazé 15 min par agitation magnétique et aspiration de l'air, de manière à éviter un assèchement de la colonne. Le récipient contenant le milieu est alors recouvert ou fermé, puis placé dans un bac rempli de glace pour procéder à l'injection à travers la colonne His-Tag pendant la nuit. Travailler avec du milieu filtré, dans des récipients propres et à 4°C permet d'éviter (ou contenir) le développement de microorganismes. Cela évite d'ajouter de l'azoture de sodium : produit à la fois toxique, pouvant gêner le procédé de cristallisation et la dérivatisation avec des atomes lourds.

- **Purification par affinité**

L'injection est effectuée sur une colonne 1ml cOmplete HisTag (Roche) fixée sur l'appareil « NGC BioRad », qui dispose d'une pompe d'injection pour l'échantillon. Pour un litre de milieu, le débit est fixé à 1 ml/min pendant environ 15h. Cette étape est donc effectuée pendant la nuit. Le filtrat d'injection est aussi collecté dans un récipient dédié, à 4°C. Peu avant la fin de l'injection, des échantillons « surnageant » et « filtrat » (ou « fraction non retenue ») sont prélevés pour comparer des niveaux d'expression ou d'activités, au besoin. Le filtrat est traité à la javel puis jeté. Le même tampon de base (HEPES-NaOH 25mM, NaCl 500 mM, pH 7,4) est utilisé pour les étapes d'équilibration, lavage et élution avec simplement des concentrations différentes en éluant : respectivement 0, 50 et 500 mM d'imidazole. Les fractions de 1 ml correspondant au pic d'élution sur le chromatogramme sont immédiatement analysées par SDS-PAGE et mélangées, pour être concentrées.

- **Concentration de la protéine**

La protéine AtFuT1 issue des fractions d'élution (purification par affinité ou filtration sur gel) est concentrée dans des concentrateurs Vivaspin 30 MWCO (Sartorius stedim) à 7000 tpm. Le volume du mélange des fractions HisTrap doit être réduit à 500 µl pour l'injection en colonne de filtration sur gel. Après cette étape, c'est la concentration en protéine qui est suivie : 1 mg / ml pour le stockage en vue de tests d'activité et 7 10 ou 14 mg/ml pour les tests de cristallisation.

- **Filtration sur gel**

La filtration sur gel sépare les protéines en fonction de leurs rayons hydrodynamiques. La colonne utilisée est la Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare) de 24 ml, adaptée à la séparation de protéines globulaires de masses moléculaires comprises entre 10 à 600 kDa. La calibration a été effectuée au laboratoire, avec des protéines globulaires. Le tampon employé est proche de celui d'HisTrap, sans imidazole et avec moins de sel : HEPES 25 mM ; NaCl 150 mM pH 7,4. Ceci est aussi le tampon de conservation de la protéine par la suite. La colonne est équilibrée par deux volumes de tampons avant d'injecter l'échantillon (500 µl d'AtFuT1 concentrée après HisTrap). Les fractions collectées sont de 500 µl par tube. Comme pour la purification par affinité, un prélèvement de chaque fraction est immédiatement effectué après élution pour analyse par SDS-PAGE. Les fractions correspondant à la portion symétrique du pic d'élution sont mélangées.

- **Mesure de la concentration de protéine AtFuT1**

Les mesures de concentrations de protéines AtFuT1 s'effectuent par dosage au spectrophotomètre, à une longueur d'onde de 280 nm. Le matériel employé au laboratoire est un nanogouttes (nanodrop 2000, Thermo Scientifique). L'absorbance des protéines dans l'UV dépend de leur composition. Deux résidus aromatiques contribuent majoritairement : le tryptophane et la tyrosine. La phénylalanine, et les cystéines par la réalisation de ponts di-sulfures, absorbent aussi dans une moindre mesure. Le coefficient d'extinction molaire à 280 nm a été calculé en ligne par le serveur ProtParameter (<http://web.expasy.org/protparam/>) à partir de la séquence primaire en acide aminé. La valeur obtenue pour His-AtFuT1<sub>Δ68</sub> : 89000 M<sup>-1</sup> x cm<sup>-1</sup>, en combinaison avec la masse molaire (59,7 kDa), permet d'obtenir la concentration massique de la protéine à partir de la mesure d'absorbance.

- **Préparation des échantillons pour la migration en gel SDS**

Un échantillon de protéine à déposer en gel SDS-PAGE est mélangé à un tampon de charge dénaturant, qui peut contenir ou non un agent réducteur. Ce tampon est composé de Tris 25 mM, SDS 1 %, glycérol 4 % et bleu de bromophénol pH 6,8. Le SDS dénature

les protéines en déstabilisant les liaisons faibles, le glycérol et le colorant permettent d'alourdir et de visualiser l'échantillon lors de son dépôt dans le gel. Un agent réducteur peut être ajouté pour réduire les protéines. Il s'agit alors régulièrement de DTT (Dithiothreitol) à 100 mM ou de  $\beta$ -mercaptoéthanol. Ce dernier, instable, est dilué de la solution stock moins d'une heure avant son utilisation, à 2 % en volume final. Les échantillons sont chauffés à 95°C pour améliorer la dénaturation des protéines et favoriser l'action du SDS. Ils sont alors centrifugés brièvement et déposés dans les puits du gel. Une fois la migration terminée, les protéines contenues dans le gel sont soit révélées par une coloration non spécifique, soit transférées sur une membrane pour être immuno-révélées par des anticorps spécifiques.

- **Analyse des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)**

Les gels SDS-PAGE (SDS PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) servent à analyser des échantillons contenant la protéine d'intérêt à tout moment du procédé de production, de purification, de conservation ou même après cristallisation. Cela permet de s'assurer de la présence de la protéine, de sa taille, de sa pureté et dans le cas d'AtFuT1 de l'abondance des deux formes. Les protéines, chargées négativement, migrent dans un champ électrique à travers un maillage plus ou moins dense selon la quantité d'acrylamide et le degré de polymérisation. La distance qu'elles parcourent à travers le gel dépend principalement de leur masse. Les gels utilisés pour la migration d'une protéine de la taille d'AtFuT1 comportent 12 % d'acrylamide-bis acrylamide (ratio 37 :1, Euromedex). Pendant la migration, ces gels baignent dans un tampon communément utilisé, nommé « tampon Laemmli » (Tris 25 mM, Glycine 200 mM, SDS 0,1 %, pH 7 – 8,5). Le courant appliqué est de 125 V pendant 1h30.

- **Coloration des gels**

En fonction de la quantité de protéine estimée dans l'échantillon, deux types de colorations sont possibles : une coloration à l'argent ou au bleu de coomassie. La coloration à l'argent consiste à fixer les protéines dans le gel par une solution d'éthanol, acide acétique et formaldéhyde puis à révéler leur présence par du nitrate d'argent (10 %). Cette technique permet de détecter à partir de 1 ng de protéine par bande. La coloration au bleu de coomassie à partir d'une solution commerciale (Instant blue, Expedeon) apparaît rapidement et permet de détecter à partir de 5 ng de protéine par bande.

- **Immunodétection sur membrane (Western-Blot)**

Cette technique consiste à transférer l'ensemble des protéines séparées par l'électrophorèse depuis le gel sur une membrane, pour ensuite reconnaître certaines d'entre elles grâce à des anticorps spécifiques. Le gel est trempé quelques minutes dans un tampon de transfert (tampon Laemmli – 20 % éthanol) puis plaqué contre une

membrane (en PVDF ou nitrocellulose). Le montage est placé dans un bac de manière à ce que les protéines migrent vers l'anode, en direction de la membrane. Le courant appliqué est de 100 V pendant 1h30. La construction His- AtFuT1 est reconnue par des anticorps commerciaux dirigés contre l'étiquette poly-histidine (penta-His, Sigma) et couplé à une enzyme : la peroxidase. La révélation se fait par l'ajout d'un réactif chromogène (TMB chromogene, ThermoFisher) dont la réaction avec la peroxydase induit la formation d'un précipité orange visible à l'œil nu.

- **Tests de déglycosylation**

La « peptide N-glycosidase A » (PNGase A, Sigma) a été utilisé à pH 5 en tampon citrate (approprié à la PNGase A). Les protéines à déglycosyler (10 µg dans 80 µl) ont été dénaturées par 0,05 % de SDS et 3 mn de chauffage à 100 °C. Du Nonidet p40 à (5 µl, 10 % final) a été ajouté pour neutraliser l'effet du SDS avant de faire agir 5 µl de PNGase A (0,25 mU). Les tubes ont été incubés 15 h à 37°C. La Fétuin de sérum de veau fœtal (Sigma-Aldrich) a été utilisée comme contrôle.

- **Spectrométrie de masse**

La masse des protéines de certains échantillons d'AtFuT1 purifiée a été déterminée par spectrométrie de masse MALDI-TOF (appareil Autoflex Speed TOF/TOF, Bruker Daltonics) à la plateforme dédiée du CERMAV. Pour une expérience MALDI (Ionisation par Désorption LASER Assistée par Matrice) les échantillons sont co-cristallisés avec une matrice d'acide sinapinique et ionisés sous vide par un LASER. Les ions émis sont séparés et analysés dans un détecteur TOF (*Time Of Flight*) qui permet de déterminer le rapport masse sur charge de l'ion ( $m/z$ ) en fonction du temps mis par l'ion à traverser l'analyseur. Un traitement informatique permet ensuite d'analyser la masse molaire de la protéine avec une erreur moyenne de 0,1 %. Pour ces mesures, AtFuT1 a été diluée à 0,2 mg/ml et mélangée à un ratio 1/1 à la matrice, en solvant TA30 (ddH<sub>2</sub>O/acétonitrile/acide trifluoroacétique ; 70/30/0.1%). Une calibration externe « Protein calibration standard II » (Bruker Daltonics) a été effectuée. Le délai d'accélération des ions pulsés a été fixé à 500 ns et le potentiel d'accélération à 19,5 kV.

- **Séquençage N-terminal des protéines**

La détermination des premiers acides aminés de la séquence N-terminale des protéines est effectuée à la plateforme de séquençage des acides aminés de l'Institut de Biologie Structurale de Grenoble. Les protéines, isolées après migration en gel SDS-PAGE et transfert sur membrane, sont mises en présence de Phényl isothiocyanate (PITC). Ce réactif forme une liaison covalente avec la fonction amine du résidu en position N-terminale. En présence d'acide trifluoroacétique, cet acide aminé en N-ter, toujours lié au PITC est clivé de la protéine pour former un dérivé thiazolinone. Puis, ce dérivé est extrait dans un solvant organique et traité avec de l'H<sub>3</sub>O<sup>+</sup> pour former un dérivé

phénylthiohydantoïne. Chaque acide aminé est ainsi converti manière séquentielle en un dérivé, qui migre ensuite à travers une colonne HPLC pour être identifié par comparaison à un standard.

- **Test d'activité par radioactivité**

La méthode employée implique l'utilisation de GDP-Fuc dont le fucose est radiomarké. Les tests sont effectués sur du xyloglycane purifié à partir de graines de Tamarin. Les concentrations en réactifs sont : 130 ng d'AtTFUT1, 10 mM de  $MnCl_2$ , 10 mM de  $MgCl_2$ , 30  $\mu M$  de GDP-Fuc non radioactif (« froid »), 1,5  $\mu M$  de GDP- $[^{14}C]$ -Fuc, en tampon HEPES-KOH 10 mM. Les réactions sont incubées à 30°C pendant 30 min. Le GDP-fucose n'ayant pas réagi en fin d'expérience est piégé à l'aide d'une résine échangeuse d'anion. Le surnageant, contenant le xyloglycane soluble, est récupéré par centrifugations de 2 min à 13 000xg. Cette fraction soluble est alors mélangée à un liquide de scintillation pour effectuer la mesure de radioactivité, avec un instrument Parckard Bell.

- **Mesures d'activité par bioluminescence**

Ces mesures ont été effectuées avec un prototype du test commercial GDP-Glo™ (Promega) dans les conditions recommandées par le fournisseur. Notamment, du GDP-Fuc ultra pur a été utilisé (Promega). Le xyloglycane lyophilisé de graines de Tamarin a été préparé à 8 mg/ml dans de l'eau. Ces deux substrats sont toujours issus des mêmes solutions mères, conservées à -20°C entre chaque expérience. Toutes les réactions ont été effectuées avec le tampon de stockage de l'enzyme (HEPES 25 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4) dans 25  $\mu L$ , en plaques 96 puis (LUMITRAC 200, Greiner). Les paramètres cinétiques ont été mesurés avec 10 ng d'AtFuT1 (0,4  $\mu g/mL$ ) et des concentrations en substrats de 3 à 300  $\mu M$  pour le GDP-Fuc et 15  $\mu g$  to 4 mg/mL pour le xyloglycane. Après 20 min d'incubation à température ambiante, les réactions ont été stoppées par l'ajout d'un volume égal de « GDP detection Reagent » (réactif qui contient l'enzyme « GDP-Glo » et la luciférase). La luminescence est lue après 1h d'incubation à température ambiante, avec l'appareil Microplate Luminometer (GloMax, Promega). Les valeurs relatives aux tests d'activités proviennent de mesures effectuées à partir d'un même lot d'enzymes, purifiées moins de 15 jours auparavant. Cette production a été aliquotée en plusieurs tubes, à 1 mg / ml et congelée à -20° C. Un nouvel aliquote a été décongelé pour chaque mesure et les dilutions ont été faites à l'identique.

- **Titration calorimétrique isotherme (ITC)**

Dans un premier temps, plusieurs essais ont été effectués pour déterminer la concentration optimale d'enzyme et de substrats à utiliser. L'appareil employé est l'ITC 200 (Microcal, GE Helathcare). Les mesures sont faites à 25°C, dans le tampon de l'enzyme (HEPES-KOH 25 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4). AtFuT1 a été placée dans la cuve à une concentration de 30  $\mu M$  et les solutions des ligands utilisées en excès de dix fois. Les

injections sont effectuées par addition de 2  $\mu\text{L}$  de ligand toutes les 120 secondes, avec une agitation à 500 tpm. Les données ont été traitées avec le logiciel Origin 7.0 par la méthode de Sindhuwinata et al., (2010). La chaleur de dilution est déterminée par le dernier point du thermogramme, à saturation complète de l'enzyme par le ligand. La ligne de base de l'amplitude a été soustraite à chaque point et la première injection a été retirée.

- **Purification du xyloglucane**

Le xyloglucane utilisé est issu de graine de Tamarin. Acheté sous forme de poudre (société Rhodia), il est davantage purifié au laboratoire par l'équipe de chimie et biotechnologie des oligosaccharides afin de dénaturer et d'éliminer les protéines. Pour cela, 10 g de poudre sont solubilisés dans 3,5 L d'eau distillée, placés sous agitation et chauffés à 100°C pendant 30 min. Une fois refroidie, la solution est centrifugée (7000 tpm, 20 min) puis filtrée sur une membrane (porosité de 12  $\mu\text{m}$ , nitrate de cellulose, société Sartorius) afin d'éliminer les impuretés résiduelles. La solution est alors concentrée par un évaporateur rotatif puis lyophilisée.

- **Préparation des fragments de xyloglucane**

Ces oligosaccharides sont générés au laboratoire par hydrolyse de xyloglucane de tamarin par l'endoglucanase de *Trichoderma reesei* (EG-II, MEGazyme). Le produit de cette hydrolyse est séparé par chromatographie d'exclusion stérique couplée à un réfractomètre, dans un second temps. Pour les expériences de cette étude, deux types d'oligosaccharides potentiellement accepteurs (car présentant un résidu galactose normalement fucosylé par l'enzyme) ont été conservés. Il s'agit des fragments « XLLGXLLG » et « XLLG », nommés en accord avec leur structure et la nomenclature internationale (Fry et al., 1993).

## **VIII.4. Imagerie de résonance des plasmons de surface (SPR)**

La SPR « Surface plasmon resonance » ou « résonance de plasmons de surface » permet de suivre l'interaction de macromolécules avec des ligands fixés à la surface d'une fine couche de métal. Le paramètre mesuré est une variation de réflectivité au cours du temps, provoquée par un changement d'indice du milieu à l'interface métal-ligand. Quand un faisceau de lumière d'un certain angle d'incidence se propage à travers un milieu d'indice de réfraction élevé, tel un prisme de verre, vers un autre d'un indice de réfraction faible, une proportion importante de la lumière est réfléchi en direction de l'interface. À un angle plus élevé, cette réflexion est complète. Dans le cas où la surface du prisme est recouverte d'une fine couche de métal (de l'or en général), une part de la

lumière incidente est absorbée. Elle est transformée en un champ électrique appelé « onde évanescente ». Cette onde passe à travers le milieu à l'indice de réfraction faible et se propage sur quelques centaines de nanomètres. Elle interagit avec les électrons mobiles de la couche de métal, appelés plasmons de surface, et décroît de manière exponentielle avec la distance par rapport au film de métal. Cette interaction de la lumière avec les plasmons provoque leur oscillation, et leur transfère une partie de l'énergie lumineuse qui n'est alors plus réfléchi. A un certain angle d'incidence survient un phénomène appelé « résonance » des plasmons. C'est de là que vient le nom : « résonance des plasmons de surface » et c'est l'angle auquel se trouve le pic d'absorption de la lumière incidente. Il se détermine par l'observation d'une chute de la lumière réfléchi (Figure VIII.6). Lorsque la composition chimique du milieu à la proximité du film d'or change, son indice de réflexion est modifié aussi. Cela induit alors un décalage de l'angle de résonance et se traduit par une augmentation de la lumière réfléchi, mesurée par une la caméra CCD.

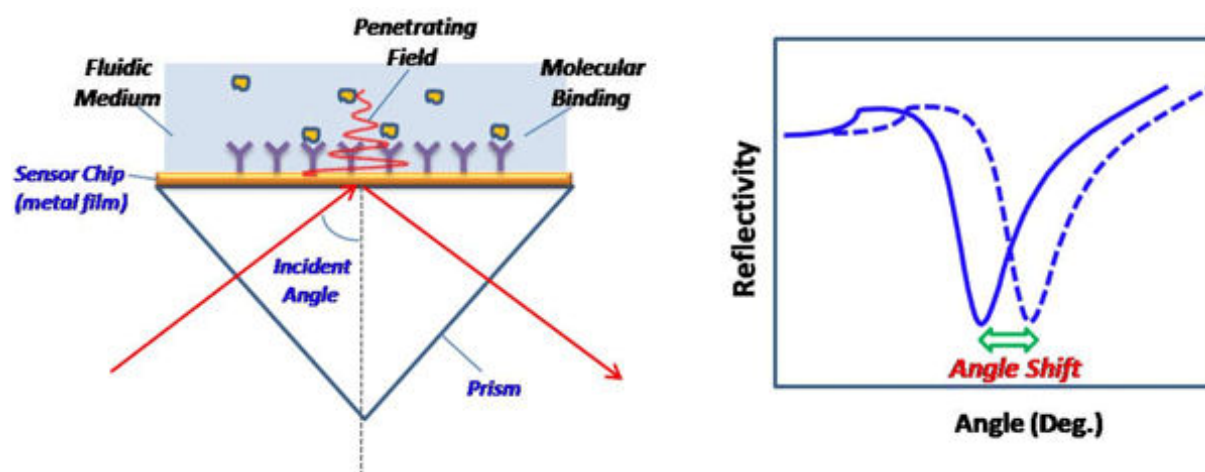


Figure VIII.6 : Principe d'un montage de détection par SPR

Une lumière incidente est dirigée sur la puce grâce à un prisme et la lumière réfléchi est détectée par une caméra CCD (à gauche). A l'angle de résonance, la lumière incidente excite les plasmons du capteur (la fine couche de métal) ce qui fait chuter l'intensité de la lumière réémise à un minimum. La valeur de cet angle dépend de l'indice du milieu à la surface de la plaque, lui même influencé par les molécules présentes. En cas de fixation de macromolécule, ce changement d'indice décale l'angle de résonance (panneau de droite).  
Figure : Biosensing instrument – technical note 102 : SPR sensitivity and detection limit.

Ainsi, les instruments basés sur la SPR utilisent un système optique pour mesurer les variations d'un indice de réfraction à proximité immédiate de la surface d'un capteur (200-300 nm). Le principe, identique à la majorité des systèmes, consiste à immobiliser un ligand à la surface d'un prisme, placée ensuite dans une chambre de micro-fluidique (Figure VIII.7). L'échantillon à analyser est injecté dans cet espace avec le même tampon que celui déjà présent (le tampon de course) en débit continu.

## Montage fluidique

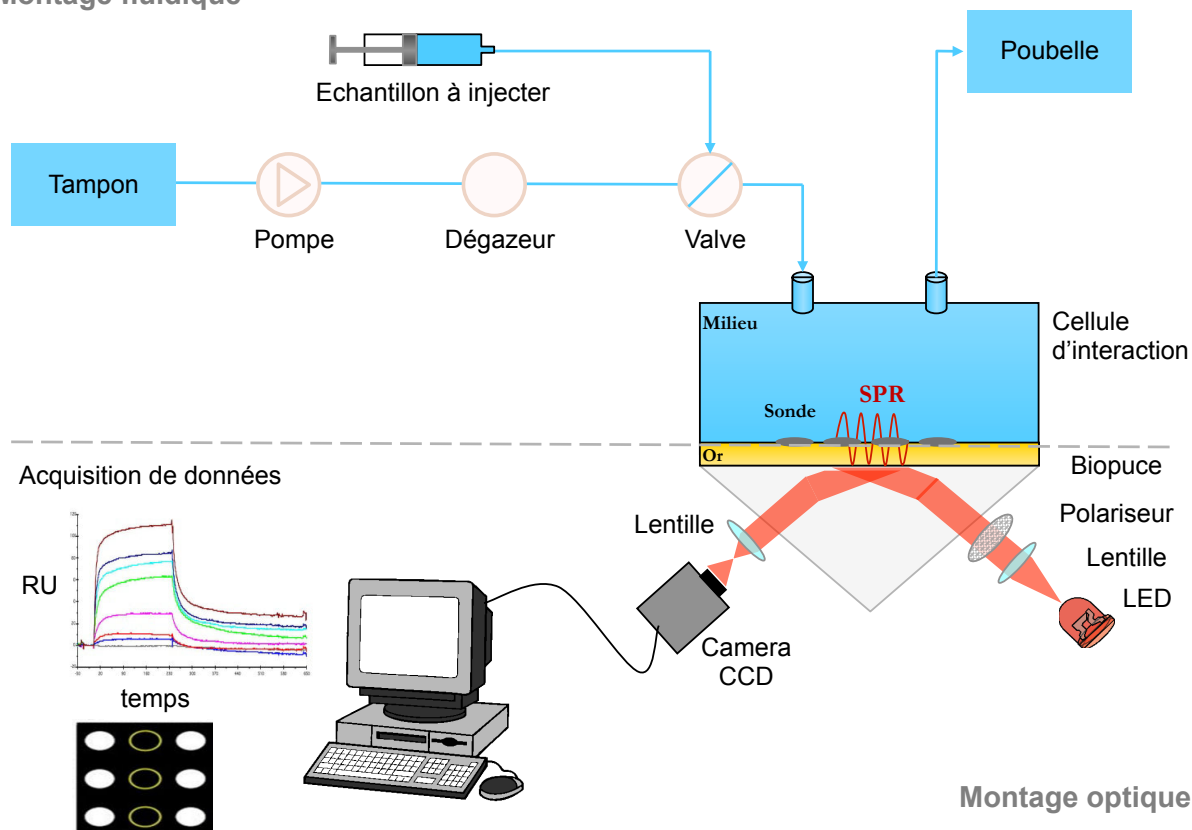


Figure VIII.7 : couplage d'un montage fluidique et optique pour mesurer des interactions entre composés par SPRI.

Explication de la technique SPR issue de Gulnara Safina, 2012 (10.1016/j.aca.2011.11.016). Figure : Fériel Méline.

En cas de liaison au ligand immobilisé, le composé présent dans le tampon s'accumule à la surface de la plaque. La résonance des plasmons de surface étant influencée par la matière accumulée sur le film d'or, une association se traduit par une variation de l'indice de réfraction et un décalage de l'angle de résonance. Cette variation d'indice en temps réel est représentée en unité de résonance (RU, Resonance Unit) en fonction du temps, sur un « sensorgramme ». À l'état stable, en tampon de course, l'angle choisi correspond à celui de résonance des plasmons, donc peu de lumière atteint le détecteur. Lors d'interactions, puisque l'angle de résonance se déplace alors que celui du faisceau reste fixe, l'intensité de la lumière réfléchie augmente. Avec la dissociation progressive du composé, induite par le flux de tampon, l'angle de résonance revient à sa position initiale et le signal diminue. Un cycle typique d'injection dont l'analyte interagit avec la sonde est présenté figure VIII.8.

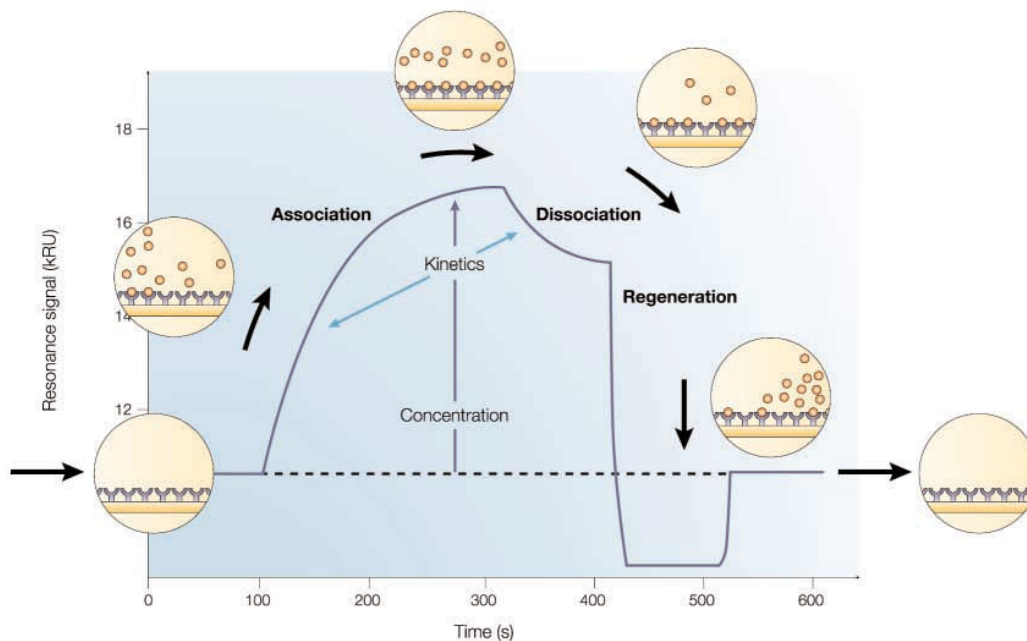


Figure VIII.8 : un cycle d'injection et d'interaction suivi par un biosenseur optique.

À  $t=0$ , le tampon de course traverse la cellule. L'angle de diffraction choisi induit le maximum d'absorption de l'onde évanescente par les plasmons de surface, le signal mesuré correspond à la ligne de base.

À  $t = 100$  s, la solution d'analyte dans le tampon de course arrive au niveau du plot contenant la sonde. Au fur et à mesure que l'analyte se lie à la surface, l'indice de réfraction du milieu environnant est modifié, ce qui augmente la proportion de lumière réfléchie, mesurée en unité de résonance. De l'analyse de cette partie de la courbe s'obtient la constante d'association. À l'équilibre, autant d'analyte s'associe et se dissocie de la sonde.

À  $t = 320$  s, la solution d'analyte est remplacée par du tampon de course uniquement et le complexe sonde-analyte commence à se dissocier. La dynamique de ce processus permet de calculer la constante de dissociation de l'interaction.

La surface de la plaque est ensuite régénérée ( $t = 420$ s) par le passage d'un tampon capable de déstabiliser toutes les liaisons faibles, pour revenir à la ligne de base avec du tampon de course.

En imagerie SPR, plusieurs dizaines ou centaines de « plots » de ligands différents sont disposés de manière spatialement définie à la surface de la plaque. L'interaction du composé à analyser vis à vis de chacun de ces plots est suivie en parallèle. Cela permet de cribler un grand nombre d'interactions, avec une sensibilité très importante, intrinsèque à la technique de SPR.

## VIII.5. Principe de la cristallisation des protéines

La technique couramment utilisée pour déterminer la structure de protéines d'une masse supérieure à 20 000 Da est la diffraction des rayons X. Cette technique implique de disposer de cristaux de qualités, c'est à dire des molécules agencées de manière ordonnée et répétée avec le minimum de contaminants. Il s'agit souvent de l'étape limitante pour déterminer une structure. Cela implique d'identifier des conditions dans lesquelles la protéine quitte la solution pour s'agencer en cristal, et de tester la qualité de diffraction des cristaux obtenus. Les protéines initialement présentes sont à l'état

d'équilibre et solvatées : c'est à dire qu'elles sont dispersées et interagissent avec le solvant (l'eau, les sels et le tampon). Lorsque des molécules sont ajoutées dans la solution, le système est modifié jusqu'au point où il n'y a plus assez de solvant pour maintenir une hydratation complète des protéines. Dans ces conditions, appelées états de sursaturation, le système n'est plus à l'équilibre. Par conséquent, des modifications s'opèrent pour minimiser l'énergie du système. Les molécules perdent leur liberté de rotation et de translation en formant de nouvelles liaisons non-covalentes entre individus. La base de la stratégie permettant d'aboutir à la formation de cristaux consiste à induire cet état de sursaturation de la solution. Cela s'obtient en modifiant les propriétés du solvant par l'ajout de précipitants ou en altérant des paramètres physiques, tels que la température. Les agrégations qui apparaissent alors correspondent à une séparation des molécules en une phase solide et une phase liquide. Cette agrégation peut s'effectuer de deux manières différentes : soit par des liaisons intermoléculaires aléatoires, ce qui crée un précipité amorphe, soit de manière répétitive et ordonnée, ce qui forme un cristal. Les précipités amorphes sont en général plus favorables d'un point de vue cinétique et apparaissent plus fréquemment, inhibant la formation de cristaux.

Les étapes communes à toute cristallisation sont :

- la nucléation, pendant laquelle la protéine doit franchir une barrière d'énergie pour former un agrégat ordonné et répété
- la croissance, lorsque l'état solide devient plus attractif pour les molécules individuelles que l'état libre en solution.
- L'arrêt de croissance avec un nouvel état d'équilibre du système

De manière à promouvoir ces étapes, une condition de sursaturation est induite pour forcer la protéine à quitter la solution mère - c'est à dire le milieu de cristallisation. Différents précipitants, ou cocktails de précipitants sont utilisés afin d'altérer les contacts entre la protéine et le solvant. Ils sont classés en fonction de leur mode d'action:

- Les sels : il s'agit du précipitant souvent majoritaire. En petite quantité, ils évitent souvent la précipitation des protéines. Ils masquent des zones chargées, ce qui empêche les attractions avec d'autres zones de charges opposées sur d'autres molécules de protéine. À l'inverse, si la concentration de sel devient très importante, les ions entrent en compétitions avec les protéines vis à vis des molécules d'eau pour maintenir leur couche d'hydratation, et donc leur solubilité. Dans cette situation les protéines (ou les ions) s'auto associent pour former des molécules plus neutres.
- Les solvants organiques et les composés organiques non volatils : sont principalement utilisés comme additifs à un autre agent précipitant. Leurs interactions avec l'eau ont pour effet de diminuer l'hydratation des molécules de

protéine. Ils doivent généralement être utilisés en faible concentration due à leurs effets dénaturants.

- Les polymères à longues chaînes et les polymères de bas poids moléculaires : le polyéthylène glycol est le plus utilisé. Les poids moléculaires varient généralement entre 400 à 20 000 Da. Comme les sels, ils entrent en compétition avec les protéines pour les molécules d'eau. Ils induisent aussi une pression d'exclusion, qui varie avec la taille du polymère
- Les tensioactifs (surfactants) : ils sont principalement utilisés pour augmenter la solubilité des protéines membranaires, comportant des zones hydrophobes.

Les phénomènes de précipitation, nucléation et croissance de cristal sont souvent expliqués par le diagramme de solubilité (Figure VIII.9). La courbe de solubilité divise l'espace en deux zones : sous-saturée et sursaturée. Chaque point de cette courbe correspond à une concentration en équilibre avec le précipitant, c'est à dire à l'arrêt de croissance d'un cristal ou au début de sa dissolution. En dessous de cette courbe, aucune cristallisation n'apparaît. Au-dessus, pour chaque concentration de précipitant, la concentration de protéine est plus élevée qu'à l'équilibre. Cette zone est, elle-même, divisible en trois parties, en fonction du niveau de sursaturation et de la dynamique qui se crée pour retourner à l'équilibre.

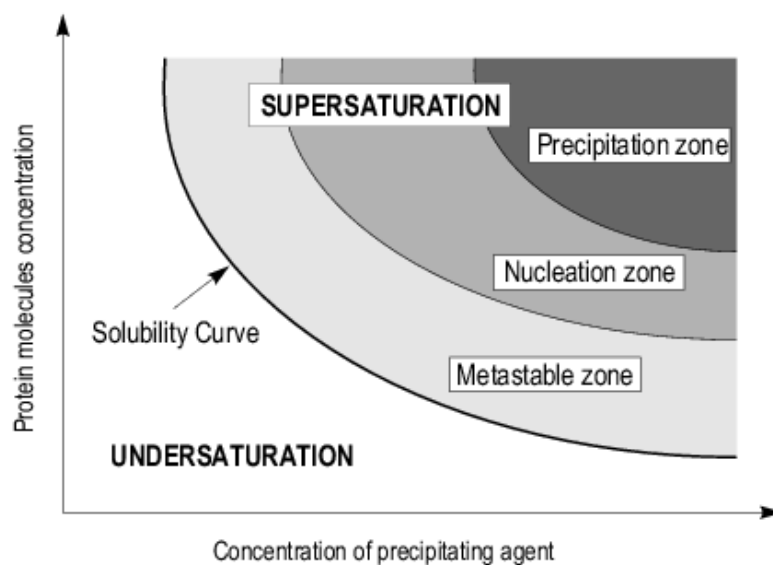


Figure VIII.9 : Diagramme de phase de cristallisation.

Représentation schématique en deux dimensions d'un diagramme de phase, illustrant les changements d'états des molécules de protéines en fonction de leur concentration et de celles de précipitants. La courbe de solubilité sépare la zone « sous saturée » et « sursaturée » en protéines. La zone sursaturée comprend une zone où les cristaux grossissent, une zone où la nucléation apparaît et une zone où la protéine précipite directement. Figure : D. Chirgadze, protein cristallisation in action, <http://www.xray.bioc.cam.ac.uk/xray>.

La zone de précipitation correspond aux concentrations où la protéine en excès se sépare immédiatement de la solution pour former un précipité. Dans la zone de

nucléation, l'excès de protéines forme des noyaux et des microcristaux, qui peuvent être confondus avec du précipité. Dans la zone métastable ou zone de transition, la nucléation peut prendre du temps à apparaître ou ne jamais avoir lieu, mais un cristal présent aura tendance à grossir. De manière à former un cristal de taille suffisante et bien ordonné, la nucléation doit se faire au bas de la zone de nucléation. Au fur et à mesure que les cristaux grossissent, la solution revient à l'état de transition. Il n'y a alors plus de nouvelles nucléations et les cristaux formés continuent à grossir jusqu'à ce que l'équilibre soit atteint. D'autres facteurs peuvent induire l'arrêt de croissance du cristal, tels que l'incorporation de molécules différentes ou endommagées. Si une molécule ne peut pas établir les mêmes contacts que la protéine parfaite, cela induit un défaut local dans le maillage cristallin. Plus ce type de défaut survient pendant la croissance du cristal, plus il y a de chance qu'elle s'arrête.

Il est souvent recommandé de travailler avec des échantillons de protéines les plus purs possibles, dont la stabilité en solution a été contrôlée. Une règle de base consiste à avoir une protéine pure à plus de 90 % et dont la distribution en DLS est centrée sur une gaussienne avec un écart type de 15 – 30 % maximum par rapport à la moyenne. Cela permet de vérifier notamment que la protéine ne forme pas d'agrégats dans son tampon. Les échantillons de protéines purifiées doivent aussi être le plus reproductibles possible, de manière à cribler des paramètres externes et non pas des variations de productions ou de purifications.

### ➤ **Stratégie de cristallisation**

Plusieurs techniques peuvent être employées pour amener une solution de protéines à un état de sursaturation. Les plus communes sont la dialyse, le micro-batch, et la diffusion de vapeur. Celle utilisée pour cette étude est la diffusion de vapeur ([Figure VIII.10](#)). Le principe consiste à utiliser l'évaporation et la diffusion de l'eau entre deux solutions pour atteindre l'état de sursaturation dans celle où se trouve la protéine. Typiquement, une goutte contenant la solution de protéines mélangée à du précipitant est équilibrée contre un réservoir contenant la solution de précipitant, à la concentration voulue.

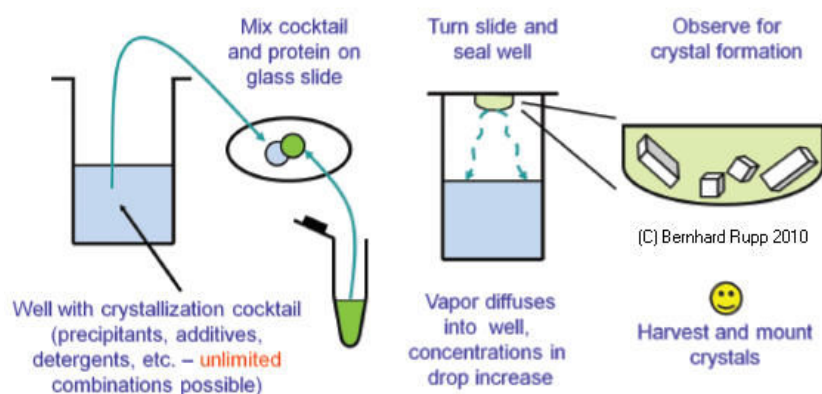


Figure VIII.10 : technique de diffusion de vapeur par « hanging drop ».

La solution de précipitant est mélangée à la celle de protéine dans un ratio variable, en général 1-1. La lamelle de verre sur laquelle est effectué le mélange est retournée et scellée par de la graisse, afin de créer un volume hermétique. L'évaporation de l'eau concentre le mélange protéine-précipitant. Dans certaines conditions, cela induit la formation et la croissance de cristaux. Les criblages en laboratoire non pourvus de systèmes automatisés s'effectuent généralement dans des plaques de 24, 50 ou 96 puits.

La différence de concentration de précipitant, entre la goutte et le puits, induit l'évaporation de l'eau de la goutte jusqu'à ce que la concentration en précipitant soit égale à celle du réservoir. Idéalement, la protéine se concentre à partir d'un état de la solution non saturé à un état sursaturé, jusqu'à ce que certains points de nucléations apparaissent (Figure VIII.11). Ensuite, les cristaux formés commencent à pousser. Les cristaux sont ensuite prélevés ou « pêchés » avec un outil approprié, pour être soit congelés soit transférés dans une autre solution.

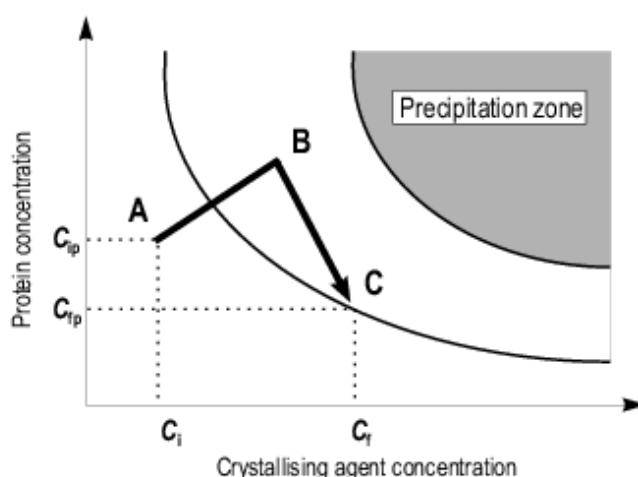


Figure VIII.11 : Les étapes de cristallisation par la technique de diffusion de vapeur

Représentation schématique en utilisant le diagramme de phase.  $C_{ip}$  et  $C_{fp}$  correspondent aux concentrations de protéines initiales et finales dans la goutte,  $C_i$  et  $C_f$  à celles de précipitants. Source : D. Chirgadze, protein crystallization in action, <http://www.xray.bioc.cam.ac.uk/xray>.

Le principe consiste à cribler un maximum de conditions en faisant varier quelques paramètres importants tels que le pH, la concentration de protéines, la température, les concentrations, les types de précipitants, etc. La quantité de paramètres pouvant être variés est presque infinie. Différentes stratégies ont été développées pour identifier des conditions prometteuses le plus rapidement possible. Les trois les plus fondamentales sont :

- Le « Grid screen », qui consiste à faire varier 1 ou 2 paramètres en gardant les autres constants. Les résultats sont faciles à interpréter mais c'est l'approche qui nécessite le plus de protéines.
- L' « incomplete factorial », les paramètres sont tous variés simultanément de manière aléatoire. Un score est attribué à chaque résultat et même ceux qui sont négatifs peuvent être interprétés.
- Le « Sparce matrix », qui reproduit des conditions fréquemment retrouvées dans la littérature à partir des résultats publiés.

Une fois que des conditions prometteuses sont identifiées, les paramètres sont criblés de façon plus fine avec la méthode du « grid screen ». De nombreux kits de criblages commerciaux sont disponibles.

### ➤ **Manipulation des cristaux**

L'exposition d'un cristal aux rayons X, très énergétiques, crée des radicaux libres qui endommagent le maillage du cristal et la structure des molécules qu'il contient. En travaillant à des températures cryogéniques de 100 K (-172°C) environ, la diffusion de ces radicaux libres est fortement ralentie. Cela atténue les dégâts liés à l'irradiation et prolonge la vie du cristal pendant la collecte des données. Les températures cryogéniques réduisent également le mouvement des molécules, ce qui améliore la qualité des données de diffraction. La difficulté induite par cette méthode est de conserver le cristal dans un environnement vitreux et amorphe, c'est à dire sans organisation cristalline. L'expansion de l'eau dans les canaux de solvant, lors de sa congélation, déstructure le maillage du cristal et induit de la diffraction supplémentaire. Cette diffraction s'observe par la présence d'anneaux sur les clichés de diffractions. Afin d'éviter ce phénomène, le cristal doit se trouver dans une solution cryoprotectante préalablement à sa congélation en azote liquide. Celle-ci doit posséder deux particularités : ne pas endommager le cristal, ni produire de glace lors de sa congélation. Des kits commerciaux existent pour cribler de nombreuses concentrations et combinaisons de précipitants, utilisés à des seuils cryoprotectants. Les informations fournies par ces kits peuvent servir de base pour réaliser des solutions proches de celles dans lesquelles la protéine cristallise.

## ➤ La dérivation de cristaux en solution d'atomes lourds

Une fois que des conditions permettant d'obtenir des cristaux de bonnes qualités sont définies, plusieurs méthodes peuvent être employées pour résoudre la structure. La plus fréquente est la technique de remplacement moléculaire. Cette dernière nécessite de disposer d'un modèle, c'est à dire d'une protéine suffisamment homologue, dont la structure a déjà été déterminée. Si aucun modèle n'est disponible, alors les techniques expérimentales employées reposent sur l'insertion d'atomes lourds dans le maillage du cristal. Les deux principales techniques impliquent soit l'insertion de sélénométhionine à la place de la méthionine, lors de la synthèse de la protéine, soit directement un trempage des cristaux en solutions d'atomes lourds. Beaucoup de difficultés sont associées à cette deuxième technique, ce qui limite son utilisation aux cas où la sélénométhionine ne peut pas être utilisée. Premièrement, il n'y a, *a priori*, pas de moyen de prédire avec certitude quel composé et quelles conditions permettront une dérivation réussie du cristal. Ce processus repose donc sur un criblage empirique, ce qui nécessite beaucoup de cristaux et de temps. Finalement, le succès de cette étape se traduit par la qualité des données de diffractions obtenues, car la présence des atomes lourds induit souvent une perte de diffraction, partielle ou totale, des cristaux. Les éléments employés sont principalement les halogènes et les métaux lourds, dont les lanthanides (terres rares). Les deux principaux paramètres influençant leur contribution à la diffraction sont : le nombre de sites occupés dans la cellule du cristal, et le numéro atomique de l'atome, en rapport avec la masse de la protéine.

---

## **Chapitre IX : Bibliographie**

---



## IX. Bibliographie

- Aam, B. B., Heggset, E. B., Norberg, A. L., Sørli, M., Vårum, K. M., & Eijsink, V. G. H. (2010). Production of chitooligosaccharides and their potential applications in medicine. *Marine Drugs*, 8(5), 1482-1517. doi :10.3390/md8051482
- Adamczyk, B., Tharmalingam, T., & Rudd, P. M. (2012). Glycans as cancer biomarkers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1820(9), 1347-1353. doi :10.1016/j.bbagen.2011.12.001
- Aharoni, A., Thieme, K., Chiu, C. P. C., Buchini, S., Lairson, L. L., Chen, H., ... Withers, S. G. (2006). High-throughput screening methodology for the directed evolution of glycosyltransferases. *Nature methods*, 3(8), 609-614. doi :10.1038/nmeth899
- Ahsen, O. Von, Voigtmann, U., Klotz, M., Nifantiev, N., Schottelius, A., Ernst, A., ... Parczyk, K. (2008). A miniaturized high-throughput screening assay for fucosyltransferase VII. *Analytical Biochemistry*, 372(1), 96-105. doi :10.1016/j.ab.2007.08.029
- Apweiler, R., Hermjakob, H., & Sharon, N. (1999). On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1473(1), 4-8. doi :10.1016/S0304-4165(99)00165-8
- Araújo, A. C., Nakhai, A., Ruda, M., Slättegård, R., Gatenholm, P., & Brumer, H. (2012). A general route to xyloglucan-peptide conjugates for the activation of cellulose surfaces. *Carbohydrate research*, 354, 116-20. doi :10.1016/j.carres.2012.03.038
- Ardèvol, A., & Rovira, C. (2011). The Molecular Mechanism of Enzymatic Glycosyl Transfer with Retention of Configuration: Evidence for a Short-Lived Oxocarbenium-Like Species. *Angewandte Chemie International Edition*, 50(46), 10897-10901. doi :10.1002/anie.201104623
- Atmodjo, M. a, Hao, Z., & Mohnen, D. (2013). Evolving views of pectin biosynthesis. *Annual review of plant biology*, 64, 747-79. doi :10.1146/annurev-arplant-042811-105534
- Atmodjo, M. a, Sakuragi, Y., Zhu, X., Burrell, a. J., Mohanty, S. S., Atwood, J. a., ... Mohnen, D. (2011). Galacturonosyltransferase (GAUT)1 and GAUT7 are the core of a plant cell wall pectin biosynthetic homogalacturonan:galacturonosyltransferase complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(50), 20225-20230. doi :10.1073/pnas.1112816108

- Ban, L., Pettit, N., Li, L., Stuparu, A. D., Cai, L., Chen, W., ... Mrksich, M. (2012). Discovery of glycosyltransferases using carbohydrate arrays and mass spectrometry. *Nature chemical biology*, 8(9), 769-773. doi :10.1038/nchembio.1022
- Bar-Peled, M., & O'Neill, M. A. (2011). Plant nucleotide sugar formation, interconversion, and salvage by sugar recycling. *Annual review of plant biology*. doi :10.1146/annurev-arplant-042110-103918
- Bashline, L., Lei, L., Li, S., & Gu, Y. (2014). Cell wall, cytoskeleton, and cell expansion in higher plants. *Molecular Plant*, 7(4), 586-600. doi :10.1093/mp/ssu018
- Baykov, a. a., Evtushenko, O. a., & Avaeva, S. M. (1988). A malachite green procedure for orthophosphate determination and its use in alkaline phosphatase-based enzyme immunoassay. *Analytical Biochemistry*, 171(2), 266-270. doi :10.1016/0003-2697(88)90484-8
- Bellincampi, D., Cervone, F., & Lionetti, V. (2014). Plant cell wall dynamics and wall-related susceptibility in plant-pathogen interactions. *Frontiers in plant science*, 5(May), 228. doi :10.3389/fpls.2014.00228
- Beltrametti, T., Bögli, N. C., Greller, G., Eibl, R., & Eibl, D. (2011). High cell density growth of High Five suspension cells in DO-controlled wave-mixed bioreactors. *BMC Proceedings*, 5(Suppl 8), P123. doi :10.1186/1753-6561-5-S8-P123
- Berkmen, M. (2012). Production of disulfide-bonded proteins in Escherichia coli. *Protein expression and purification*, 82(1), 240-51. doi :10.1016/j.pep.2011.10.009
- Bolam, D. N., Roberts, S., Proctor, M. R., Turkenburg, J. P., Dodson, E. J., Martinez-Fleites, C., Gilbert, H. J. (2007). The crystal structure of two macrolide glycosyltransferases provides a blueprint for host cell antibiotic immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(13), 5336-5341. doi :10.1073/pnas.0607897104
- Bowles, D., Isayenkova, J., Lim, E. K., & Poppenberger, B. (2005). Glycosyltransferases: Managers of small molecules. *Current Opinion in Plant Biology*, 8(3 SPEC. ISS.), 254-263. doi :10.1016/j.pbi.2005.03.007
- Bowles, D., Lim, E.-K., Poppenberger, B., & Vaistij, F. E. (2006). Glycosyltransferases of lipophilic small molecules. *Annual review of plant biology*, 57, 567-597. doi :10.1146/annurev.arplant.57.032905.105429
- Brazier-Hicks, M., Offen, W. a, Gershater, M. C., Revett, T. J., Lim, E.-K., Bowles, D. J., ... Edwards, R. (2007). Characterization and engineering of the bifunctional N- and O-glucosyltransferase involved in xenobiotic metabolism in plants. *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(51), 20238-20243.  
doi :10.1073/pnas.0706421104
- Brennan, M., & Harris, P. J. (2011). Distribution of fucosylated xyloglucans among the walls of different cell types in monocotyledons determined by immunofluorescence microscopy. *Molecular plant*, 4(1), 144-56. doi :10.1093/mp/ssq067
- Breton, C., Fournel-Gigleux, S., & Palcic, M. M. (2012). Recent structures, evolution and mechanisms of glycosyltransferases. *Current opinion in structural biology*, 22(5), 540-9. doi :10.1016/j.sbi.2012.06.007
- Breton, C., & Imberty, A. (1999). Structure / function studies of glycosyltransferases, 563-571.
- Breton, C., Snajdrová, L., Jeanneau, C., Koca, J., & Imberty, A. (2006). Structures and mechanisms of glycosyltransferases. *Glycobiology*, 16(2), 29R-37R. doi :10.1093/glycob/cwj016
- Breton, C., Šnajdrová, L., Jeanneau, C., Koča, J., & Imberty, A. (2006). Structures and mechanisms of glycosyltransferases. *Glycobiology*. doi :10.1093/glycob/cwj016
- Brooks, S. a, Carter, T. M., Royle, L., Harvey, D. J., Fry, S. a, Kinch, C., ... Rudd, P. M. (2008). Altered glycosylation of proteins in cancer: what is the potential for new anti-tumour strategies. *Anticancer Agents Med Chem*, 8(1), 2-21. doi :10.2174/187152008783330860
- Brzezinski, K., Stepkowski, T., Panjikar, S., Bujacz, G., & Jaskolski, M. (2007). High-resolution structure of NodZ fucosyltransferase involved in the biosynthesis of the nodulation factor. *Acta Biochimica Polonica*, 54(3), 537-549.
- Burton, R. a, Gidley, M. J., & Fincher, G. B. (2010). Heterogeneity in the chemistry, structure and function of plant cell walls. *Nature chemical biology*, 6(10), 724-732. doi :10.1038/nchembio.439
- Burton, R. a, Wilson, S. M., Hrmova, M., Harvey, A. J., Shirley, N. J., Medhurst, A., ... Fincher, G. B. (2006). Cellulose Synthase – Like CslF Genes. *Science*, 1940(2006), 1940-1942. doi :10.1126/science.1122975
- Burton, R. a., & Fincher, G. B. (2014). Evolution and development of cell walls in cereal grains. *Frontiers in Plant Science*, 5(September), 1-15. doi :10.3389/fpls.2014.00456
- Cantarel, B. I., Coutinho, P. M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V., & Henrissat, B. (2009). The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): An expert resource for glycogenomics. *Nucleic Acids Research*, 37(SUPPL. 1), 233-238.

doi :10.1093/nar/gkn663

- Carpita, N. C. (2011). Update on mechanisms of plant cell wall biosynthesis: how plants make cellulose and other (1→4)-β-D-Glycans. *Plant Physiology*, 155(January), 171-184. doi :10.1104/pp.110.163360
- Carpita, N. C. (2012). Progress in the biological synthesis of the plant cell wall: New ideas for improving biomass for bioenergy. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(3), 330-337. doi :10.1016/j.copbio.2011.12.003
- Cavalier, D. M., & Keegstra, K. (2006). Two xyloglucan xylosyltransferases catalyze the addition of multiple xylosyl residues to cellohexaose. *Journal of Biological Chemistry*, 281(45), 34197-34207. doi :10.1074/jbc.M606379200
- Cavalier, D. M., Lerouxel, O., Neumetzler, L., Yamauchi, K., Reinecke, A., Freshour, G., ... Keegstra, K. (2008). Disrupting two *Arabidopsis thaliana* xylosyltransferase genes results in plants deficient in xyloglucan, a major primary cell wall component. *The Plant cell*, 20(6), 1519-37. doi :10.1105/tpc.108.059873
- Chang, A., Singh, S., Phillips, G. N., & Thorson, J. S. (2011). Glycosyltransferase structural biology and its role in the design of catalysts for glycosylation. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(6), 800-808. doi :10.1016/j.copbio.2011.04.013
- Chazalet, V., Uehara, K., Geremia, R. a., & Breton, C. (2001). Identification of essential amino acids in the *Azorhizobium caulinodans* fucosyltransferase NodZ. *Journal of Bacteriology*, 183(24), 7067-7075. doi :10.1128/JB.183.24.7067-7075.2001
- Chen, C.-I., Keusch, J. J., Klein, D., Hess, D., Hofsteenge, J., & Gut, H. (2012). Structure of human POFUT2: insights into thrombospondin type 1 repeat fold and O-fucosylation. *The EMBO Journal*, 31(14), 3183-3197. doi :10.1038/emboj.2012.143
- Chevalier, L., Bernard, S., Ramdani, Y., Lamour, R., Bardor, M., Lerouge, P., ... Driouich, A. (2010). Subcompartment localization of the side chain xyloglucan-synthesizing enzymes within Golgi stacks of tobacco suspension-cultured cells. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, 64(6), 977-89. doi :10.1111/j.1365-313X.2010.04388.x
- Chou, Y.-H., Pogorelko, G., Young, Z. T., & Zabortina, O. a. (2014). Protein-Protein Interactions Among Xyloglucan-Synthesizing Enzymes and Formation of Golgi-Localized Multiprotein Complexes. *Plant and Cell Physiology*, 56(2), 255-267. doi :10.1093/pcp/pcu161
- Chou, Y.-H., Pogorelko, G., & Zabortina, O. a. (2012). Xyloglucan xylosyltransferases XXT1, XXT2, and XXT5 and the glucan synthase CSLC4 form Golgi-localized multiprotein

- complexes. *Plant physiology*, 159(4), 1355-66. doi :10.1104/pp.112.199356
- Chou, Y.-H., Pogorelko, G., & Zabortina, O. A. (2012). Xyloglucan Xylosyltransferases XXT1, XXT2, and XXT5 and the Glucan Synthase CSLC4 Form Golgi-Localized Multiprotein Complexes. *PLANT PHYSIOLOGY*. doi :10.1104/pp.112.199356
- Chung, S.-Y., Nam, S.-W., Lim, J., Park, S., & Yoon, J. (2009). A highly selective cyanide sensing in water via fluorescence change and its application to in vivo imaging. *Chemical communications (Cambridge, England)*, (20), 2866-2868. doi :10.1039/b901140d
- Cocuron, J.-C., Lerouxel, O., Drakakaki, G., Alonso, A. P., Liepman, A. H., Keegstra, K., ... Wilkerson, C. G. (2007). A gene from the cellulose synthase-like C family encodes a beta-1,4 glucan synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(20), 8550-8555. doi :10.1073/pnas.0703133104
- Cosgrove, D. J. (2005). Growth of the plant cell wall. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 6(November), 850-861. doi :10.1038/nrm1746
- Czemplik, M., Kulma, A., Bazela, K., & Szopa, J. (2012). The biomedical potential of genetically modified flax seeds overexpressing the glucosyltransferase gene. *BMC complementary and alternative medicine*, 12(1), 251. doi :10.1186/1472-6882-12-251
- Damasceno, L. M., Huang, C. J., & Batt, C. a. (2012). Protein secretion in *Pichia pastoris* and advances in protein production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(1), 31-39. doi :10.1007/s00253-011-3654-z
- Davis, B. G. (2002). Synthesis of glycoproteins. *Chemical Reviews*, 102(2), 579-601. doi :10.1021/cr0004310
- Davis, J., Brandizzi, F., Liepman, A. H., & Keegstra, K. (2010). Arabidopsis mannan synthase CSLA9 and glucan synthase CSLC4 have opposite orientations in the Golgi membrane. *Plant Journal*, 64(6), 1028-1037. doi :10.1111/j.1365-313X.2010.04392.x
- De Bruyn, F., Maertens, J., Beauprez, J., Soetaert, W., & De Mey, M. (2015). Biotechnological advances in UDP-sugar based glycosylation of small molecules. *Biotechnology Advances*, 33(2), 288-302. doi :10.1016/j.biotechadv.2015.02.005
- de Rond, T., Danielewicz, M., & Northen, T. (2014). High throughput screening of enzyme activity with mass spectrometry imaging. *Current opinion in biotechnology*, 31C, 1-9. doi :10.1016/j.copbio.2014.07.008

- Del Bem, L. E. V, & Vincentz, M. G. a. (2010). Evolution of xyloglucan-related genes in green plants. *BMC evolutionary biology*, 10(1), 341. doi:10.1186/1471-2148-10-341
- Deng, C., & Chen, R. R. (2004). A pH-sensitive assay for galactosyltransferase. *Analytical Biochemistry*, 330(2), 219-226. doi :10.1016/j.ab.2004.03.014
- Desveaux, D., Faik, A., & Maclachlan, G. (1998). Fucosyltransferase and the Biosynthesis of Storage and Structural Xyloglucan in Developing Nasturtium Fruits1. *Plant physiology*, 118(3), 885-894. doi :10.1104/pp.118.3.885
- Dilokpimol, A., Poulsen, C. P., Vereb, G., Kaneko, S., Schulz, A., & Geshi, N. (2014). Galactosyltransferases from *Arabidopsis thaliana* in the biosynthesis of type II arabinogalactan: molecular interaction enhances enzyme activity. *BMC plant biology*, 14, 90. doi :10.1186/1471-2229-14-90
- Ding, H., Griesel, C., Nimtz, M., Conradt, H. S., Weich, H. a, & Jäger, V. (2003). Molecular cloning, expression, purification, and characterization of soluble full-length, human interleukin-3 with a baculovirus–insect cell expression system. *Protein Expression and Purification*, 31(1), 34-41. doi :10.1016/S1046-5928(03)00138-4
- Doblin, M. S., Pettolino, F. a, Wilson, S. M., Campbell, R., Burton, R. a, Fincher, G. B., ... Bacic, A. (2009). A barley cellulose synthase-like CSLH gene mediates (1,3;1,4)-beta-D-glucan synthesis in transgenic *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(14), 5996-6001. doi :10.1073/pnas.0902019106
- Dojima, T., Nishina, T., Kato, T., Uno, T., Yagi, H., Kato, K., & Park, E. Y. (2009). Comparison of the N-linked glycosylation of human  $\beta$ 1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 2 expressed in insect cells and silkworm larvae. *Journal of Biotechnology*, 143(1), 27-33. doi :10.1016/j.jbiotec.2009.06.013
- Domozych, D. S., Ciancia, M., Fangel, J. U., Mikkelsen, M. D., Ulvskov, P., & Willats, W. G. T. (2012). The Cell Walls of Green Algae: A Journey through Evolution and Diversity. *Frontiers in plant science*, 3(May), 82. doi :10.3389/fpls.2012.00082
- Driouich, A., Follet-Gueye, M.-L., Bernard, S., Kousar, S., Chevalier, L., Vicré-Gibouin, M., & Lerouxel, O. (2012). Golgi-Mediated Synthesis and Secretion of Matrix Polysaccharides of the Primary Cell Wall of Higher Plants. *Frontiers in Plant Science*, 3(April), 1-15. doi :10.3389/fpls.2012.00079
- Drugmand, J.-C. (2007). *Characterization of Insect Cell Lines is Required for Appropriate Industrial Processes*.

- EDMAN, P. (1956). Mechanism of the Phenyl Isothiocyanate Degradation of Peptides. *Nature*, 177(4510), 667-668.
- Errey, J. C., Lee, S. S., Gibson, R. P., Martinez Fleites, C., Barry, C. S., Jung, P. M. J., ... Davies, G. J. (2010). Mechanistic Insight into Enzymatic Glycosyl Transfer with Retention of Configuration through Analysis of Glycomimetic Inhibitors. *Angewandte Chemie International Edition*, 49(7), 1234-1237. doi :10.1002/anie.200905096
- Faik, A., Bar-peled, M., Amy, E., Zeng, W., Perrin, R. M., Wilkerson, C., ... Derocher, A. E. (2000). Biochemical Characterization and Molecular Cloning of an an alpha -1,2-Fucosyltransferase That Catalyzes the Last Step of Cell Wall Xyloglucan Biosynthesis in Pea. *The Journal of biological chemistry*, 275(19), 15082-15089. doi :10.1074/jbc.M000677200
- Faik, A., Bar-Peled, M., DeRocher, A. E., Zeng, W., Perrin, R. M., Wilkerson, C., ... Keegstra, K. (2000). Biochemical characterization and molecular cloning of an alpha-1,2-fucosyltransferase that catalyzes the last step of cell wall xyloglucan biosynthesis in pea. *Journal of Biological Chemistry*, 275(20), 15082-15089. doi :10.1074/jbc.M000677200
- Faik, A., Price, N. J., Raikhel, N. V., & Keegstra, K. (2002). An Arabidopsis gene encoding an alpha-xylosyltransferase involved in xyloglucan biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(11), 7797-7802. doi :10.1073/pnas.102644799
- Fangel, J. U., Ulvskov, P., Knox, J. P., Mikkelsen, M. D., Harholt, J., Popper, Z. a., & Willats, W. G. T. (2012). Cell wall evolution and diversity. *Frontiers in Plant Science*, 3(July), 1-8. doi :10.3389/fpls.2012.00152
- Ferrari, S. (2013). Oligogalacturonides: plant damage-associated molecular patterns and regulators of growth and development. *Frontiers in Plant Science*, 4(March), 1-9. doi :10.3389/fpls.2013.00049
- Ferrè, F., & Clote, P. (2005). DiANNA: A web server for disulfide connectivity prediction. *Nucleic Acids Research*, 33(SUPPL. 2), 230-232. doi :10.1093/nar/gki412
- Francocci, F., Bastianelli, E., Lionetti, V., Ferrari, S., De Lorenzo, G., Bellincampi, D., & Cervone, F. (2013). Analysis of pectin mutants and natural accessions of Arabidopsis highlights the impact of de-methyl-esterified homogalacturonan on tissue saccharification. *Biotechnology for biofuels*, 6(1), 163. doi :10.1186/1754-6834-6-163
- Fritz, T. a, Hurley, J. H., Trinh, L.-B., Shiloach, J., & Tabak, L. a. (2004). The beginnings of mucin biosynthesis: the crystal structure of UDP-GalNAc:polypeptide alpha-N-

- acetylgalactosaminyltransferase-T1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(43), 15307-15312. doi :10.1073/pnas.0405657101
- Fritz, T. a., Raman, J., & Tabak, L. a. (2006). Dynamic association between the catalytic and lectin domains of human UDP-GalNAc:polypeptide ??-N-acetylgalactosaminyltransferase-2. *Journal of Biological Chemistry*, 281(13), 8613-8619. doi :10.1074/jbc.M513590200
- Fry, S. C., York, W. S., Albersheim, P., Darvill, a, Hayashi, T., Joseleau, J. P., ... White, a R. (1993). An unambiguous nomenclature for xyloglucan-derived oligosaccharides. *Physiologia Plantarum*, 89(1), 1-3. doi :10.1034/j.1399-3054.1993.890101.x
- Gantt, R. W., Goff, R. D., Williams, G. J., & Thorson, J. S. (2008). Probing the aglycon promiscuity of an engineered glycosyltransferase. *Angewandte Chemie - International Edition*, 47(46), 8889-8892. doi :10.1002/anie.200803508
- Geladopoulos, T. P., Sotiroidis, T. G., & Evangelopoulos, A. E. (1991). A malachite green colorimetric assay for protein phosphatase activity. *Analytical Biochemistry*, 192(1), 112-116. doi :10.1016/0003-2697(91)90194-X
- Golovanov, A. P., Hautbergue, G. M., Wilson, S. a, & Lian, L.-Y. (2004). A simple method for improving protein solubility and long-term stability. *Journal of the American Chemical Society*, 126(29), 8933-8939. doi :10.1021/ja049297h
- Gordon, R. D., Sivarajah, P., Satkunarajah, M., Ma, D., Tarling, C. a, Vizitiu, D., ... Rini, J. M. (2006). X-ray Crystal Structures of Rabbit N-acetylglucosaminyltransferase I (GnT I) in Complex with Donor Substrate Analogues. *Journal of Molecular Biology*, 360(1), 67-79. doi :10.1016/j.jmb.2006.04.058
- Griffith, B. R., & Thorson, J. S. (2006). A sweet success for substrate engineering. *Nature chemical biology*, 2(12), 659-660. doi :10.1038/nchembio1206-659
- Gunl, M., Neumetzler, L., Kraemer, F., de Souza, a, Schultink, a, Pena, M., ... Pauly, M. (2011). AXY8 Encodes an -Fucosidase, Underscoring the Importance of Apoplastic Metabolism on the Fine Structure of Arabidopsis Cell Wall Polysaccharides. *The Plant Cell*, 23(November), 4025-4040. doi :10.1105/tpc.111.089193
- Günl, M., & Pauly, M. (2011). AXY3 encodes a  $\alpha$ -xylosidase that impacts the structure and accessibility of the hemicellulose xyloglucan in Arabidopsis plant cell walls. *Planta*, 233(4), 707-719. doi :10.1007/s00425-010-1330-7
- Hanna, R., Brummell, D. a, Camirand, a, Hensel, a, Russell, E. F., & MacLachlan, G. a. (1991). Solubilization and properties of GDP-fucose: xyloglucan 1,2-alpha-L-

- fucosyltransferase from pea epicotyl membranes. *Archives of biochemistry and biophysics*, 290(1), 7-13. doi :10.1016/0003-9861(91)90584-6
- Hansen, S. F., Bettler, E., Wimmerova, M., Imberty, A., Lerouxel, O., & Breton, C. (2009). Combination of Several Bioinformatics Approaches for the Identification of New Putative Glycosyltransferases in Arabidopsis. *Journal of Proteome Research*, 743-753. doi :10.1021/pr800808m
- Hansen, S. F., Harholt, J., Oikawa, A., & Scheller, H. V. (2012). Plant Glycosyltransferases Beyond CAZy: A Perspective on DUF Families. *Frontiers in plant science*, 3(March), 59. doi :10.3389/fpls.2012.00059
- Harholt, J., Jensen, J. K., Verhertbruggen, Y., Søgaard, C., Bernard, S., Nafisi, M., ... Scheller, H. V. (2012). ARAD proteins associated with pectic Arabinan biosynthesis form complexes when transiently overexpressed in planta. *Planta*, 236(1), 115-128. doi :10.1007/s00425-012-1592-3
- Hassinen, A., Rivinoja, A., Kauppila, A., & Kellokumpu, S. (2010). Golgi N-glycosyltransferases form both homo- and heterodimeric enzyme complexes in live cells. *Journal of Biological Chemistry*, 285(23), 17771-17777. doi :10.1074/jbc.M110.103184
- Hayashi, Y., Horibata, Y., Sakaguchi, K., Okino, N., & Ito, M. (2005). A sensitive and reproducible assay to measure the activity of glucosylceramide synthase and lactosylceramide synthase using HPLC and fluorescent substrates. *Analytical Biochemistry*, 345(2), 181-186. doi :10.1016/j.ab.2005.05.029
- Hoffman, M., Jia, Z., Peña, M. J., Cash, M., Harper, A., Blackburn, A. R., ... York, W. S. (2005). Structural analysis of xyloglucans in the primary cell walls of plants in the subclass Asteridae. *Carbohydrate Research*, 340(11), 1826-1840. doi :10.1016/j.carres.2005.04.016
- Hrmova, M., Stone, B. a., & Fincher, G. B. (2010). High-yield production, refolding and a molecular modelling of the catalytic module of (1,3)- $\beta$ -D-glucan (curdlan) synthase from *Agrobacterium* sp. *Glycoconjugate Journal*, 27(4), 461-476. doi :10.1007/s10719-010-9291-4
- Ihara, H., Hanashima, S., Tsukamoto, H., Yamaguchi, Y., Taniguchi, N., & Ikeda, Y. (2013). Difucosylation of chitooligosaccharides by eukaryote and prokaryote  $\alpha$ 1,6-fucosyltransferases. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1830(10), 4482-4490. doi :10.1016/j.bbagen.2013.05.013
- Ihara, H., Ikeda, Y., Toma, S., Wang, X., Suzuki, T., Gu, J., ... Honke, K. (2007). Crystal

- structure of mammalian  $\alpha$ 1,6-fucosyltransferase, FUT8. *Glycobiology*, 17(5), 455-466.
- Jacobs, P. P., Geysens, S., Vervecken, W., Contreras, R., & Callewaert, N. (2009). Engineering complex-type N-glycosylation in *Pichia pastoris* using GlycoSwitch technology. *Nature protocols*, 4(1), 58-70. doi :10.1038/nprot.2008.213
- Je, J. Y., & Kim, S. K. (2012). *Chitooligosaccharides as Potential Nutraceuticals. Production and Bioactivities*, 65. *Advances in Food and Nutrition Research* (1<sup>re</sup> éd.). (S.l.) : Elsevier Inc. doi :10.1016/B978-0-12-416003-3.00021-4
- Jefferys, B. R., Kelley, L. a., Sergot, M. J., Fox, J., & Sternberg, M. J. E. (2006). Capturing expert knowledge with argumentation: a case study in bioinformatics. *Bioinformatics*, 22(8), 924-933. doi :10.1093/bioinformatics/btl018
- Jensen, J. K., Schultink, A., Keegstra, K., Wilkerson, C. G., & Pauly, M. (2012). RNA-seq analysis of developing nasturtium seeds (*Tropaeolum majus*): Identification and characterization of an additional galactosyltransferase involved in xyloglucan biosynthesis. *Molecular Plant*, 5(5), 984-992. doi :10.1093/mp/sss032
- Jinek, M., Chen, Y.-W., Clausen, H., Cohen, S. M., & Conti, E. (2006). Structural insights into the Notch-modifying glycosyltransferase Fringe. *Nature structural & molecular biology*, 13(10), 945-946. doi :10.1038/nsmb1144
- Kellokumpu, S., Hassinen, A., & Glumoff, T. (2015). Glycosyltransferase complexes in eukaryotes: long-known, prevalent but still unrecognized. *Cellular and Molecular Life Sciences*. doi :10.1007/s00018-015-2066-0
- Kim, E.-K., Je, J.-Y., Lee, S.-J., Kim, Y.-S., Hwang, J.-W., Sung, S.-H., ... Park, P.-J. (2012). Chitooligosaccharides induce apoptosis in human myeloid leukemia HL-60 cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 22(19), 6136-6138. doi :10.1016/j.bmcl.2012.08.030
- Kochumalayil, J. J., Zhou, Q., Kasai, W., & Berglund, L. a. (2013). Regioselective modification of a xyloglucan hemicellulose for high-performance biopolymer barrier films. *Carbohydrate polymers*, 93(2), 466-72. doi :10.1016/j.carbpol.2012.12.041
- Kochumalayil, J., Sehaqui, H., Zhou, Q., & Berglund, L. a. (2010). Tamarind seed xyloglucan – a thermostable high-performance biopolymer from non-food feedstock. *Journal of Materials Chemistry*, 20(21), 4321. doi :10.1039/c0jm00367k
- Kötzler, M. P., Blank, S., Bantleon, F. I., Wienke, M., Spillner, E., & Meyer, B. (2013). Donor assists acceptor binding and catalysis of human  $\alpha$ 1,6- fucosyltransferase. *ACS*

- Kranz, C., Ng, B. G., Sun, L., Sharma, V., Eklund, E. a., Miura, Y., ... Freeze, H. H. (2007). COG8 deficiency causes new congenital disorder of glycosylation type IIh. *Human Molecular Genetics*, 16(7), 731-741. doi :10.1093/hmg/ddm028
- Krauth, C., Fedoryshyn, M., Schleberger, C., Luzhetskyy, A., & Bechthold, A. (2009). Engineering a Function into a Glycosyltransferase. *Chemistry and Biology*, 16(1), 28-35. doi :10.1016/j.chembiol.2008.12.003
- Kuhn, B., Benz, J., Greif, M., Engel, A. M., Sobek, H., & Rudolph, M. G. (2013). The structure of human -2,6-sialyltransferase reveals the binding mode of complex glycans. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 69(9), 1826-1838. doi :10.1107/S0907444913015412
- Kumagai, K., Kojima, H., Okabe, T., & Nagano, T. (2014). Development of a highly sensitive, high-throughput assay for glycosyltransferases using enzyme-coupled fluorescence detection. *Analytical Biochemistry*, 447(1), 146-155. doi :10.1016/j.ab.2013.11.025
- Lairson, L. L., Henrissat, B., Davies, G. J., & Withers, S. G. (2008). Glycosyltransferases: structures, functions, and mechanisms. *Annual review of biochemistry*. doi :10.1146/annurev.biochem.76.061005.092322
- Lao, J., Oikawa, A., Bromley, J. R., McInerney, P., Suttangkakul, A., Smith-Moritz, A. M., ... Heazlewood, J. L. (2014). The plant glycosyltransferase clone collection for functional genomics. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, 79(3), 517-29. doi :10.1111/tpj.12577
- Leboeuf, E., Immerzeel, P., Gibon, Y., Steup, M., & Pauly, M. (2008). High-throughput functional assessment of polysaccharide-active enzymes using matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry as exemplified on plant cell wall polysaccharides. *Analytical Biochemistry*, 373(1), 9-17. doi :10.1016/j.ab.2007.10.007
- Lee, H. S., & Thorson, J. S. (2011). Development of a universal glycosyltransferase assay amenable to high-throughput formats. *Analytical Biochemistry*, 418(1), 85-88. doi :10.1016/j.ab.2011.06.016
- Lee, J. E., Fusco, M. L., & Ollmann Saphire, E. (2009). An efficient platform for screening expression and crystallization of glycoproteins produced in human cells. *Nature protocols*, 4(4), 592-604. doi :10.1038/nprot.2009.29
- Lee, K. J. D., Marcus, S. E., & Knox, J. P. (2011). Cell wall biology: Perspectives from cell

- wall imaging. *Molecular Plant*, 4(2), 212-219. doi :10.1093/mp/ssq075
- Leloir, L. F. (1964). Nucleoside Diphosphate Sugars and Saccharide Synthesis H6X f0TPh OHH20. *Biochemistry*, 91(1), 2-8.
- Lerouge, P., O'Neill, M. a., Darvill, a. G., & Albersheim, P. (1993). Structural characterization of endo-glycanase-generated oligoglycosyl side chains of rhamnogalacturonan I. *Carbohydrate Research*, 243(2), 359-371. doi :10.1016/0008-6215(93)87039-U
- Lerouxel, O., Choo, T. S., Séveno, M., Usadel, B., Faye, L., Lerouge, P., & Pauly, M. (2002). Rapid structural phenotyping of plant cell wall mutants by enzymatic oligosaccharide fingerprinting. *Plant physiology*, 130(4), 1754-1763. doi :10.1104/pp.011965
- Li, L., Modolo, L. V., Escamilla-Trevino, L. L., Achnine, L., Dixon, R. a., & Wang, X. (2007). Crystal Structure of Medicago truncatula UGT85H2 - Insights into the Structural Basis of a Multifunctional (Iso)flavonoid Glycosyltransferase. *Journal of Molecular Biology*, 370(5), 951-963. doi :10.1016/j.jmb.2007.05.036
- Li, S., Bashline, L., Lei, L., & Gu, Y. (2014). Cellulose synthesis and its regulation. *The Arabidopsis book / American Society of Plant Biologists*, 12, e0169. doi :10.1199/tab.0169
- Liang, Y., Basu, D., Pattathil, S., Xu, W. L., Venetos, A., Martin, S. L., ... Showalter, A. M. (2013). Biochemical and physiological characterization of fut4 and fut6 mutants defective in arabinogalactan-protein fucosylation in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, 64(18), 5537-5551. doi :10.1093/jxb/ert321
- Lira-Navarrete, E., Valero-González, J., Villanueva, R., Martínez-Júlvez, M., Tejero, T., Merino, P., ... Hurtado-Guerrero, R. (2011). Structural insights into the mechanism of protein O-fucosylation. *PLoS ONE*, 6(9). doi :10.1371/journal.pone.0025365
- Liu, J., Willför, S., & Xu, C. (2015). A review of bioactive plant polysaccharides: Biological activities, functionalization, and biomedical applications. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 5(1), 31-61. doi :10.1016/j.bcdf.2014.12.001
- Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P. M., & Henrissat, B. (2014). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Research*, 42(D1), D490-D495. doi :10.1093/nar/gkt1178
- Lund, C. H., Bromley, J. R., Stenbaek, a., Rasmussen, R. E., Scheller, H. V., & Sakuragi, Y. (2014a). A reversible Renilla luciferase protein complementation assay for rapid identification of protein-protein interactions reveals the existence of an interaction

- network involved in xyloglucan biosynthesis in the plant Golgi apparatus. *Journal of Experimental Botany*. doi :10.1093/jxb/eru401
- Lund, C. H., Bromley, J. R., Stenbaek, a., Rasmussen, R. E., Scheller, H. V., & Sakuragi, Y. (2014b). A reversible Renilla luciferase protein complementation assay for rapid identification of protein-protein interactions reveals the existence of an interaction network involved in xyloglucan biosynthesis in the plant Golgi apparatus. *Journal of Experimental Botany*, 66(1), 85-97. doi :10.1093/jxb/eru401
- Ma, B., Simala-Grant, J. L., & Taylor, D. E. (2006). Fucosylation in prokaryotes and eukaryotes. *Glycobiology*, 16(12), 158R-184R. doi :10.1093/glycob/cwl040
- Madson, M., Dunand, C., Li, X., Verma, R., Vanzin, G. F., Caplan, J., ... Reiter, W.-D. (2003). The MUR3 gene of Arabidopsis encodes a xyloglucan galactosyltransferase that is evolutionarily related to animal exostosins. *The Plant cell*, 15(7), 1662-1670. doi :10.1105/tpc.009837
- Mallevre, F., Roget, A., Minon, T., Kervella, Y., Ropartz, D., Ralet, M. C., ... Livache, T. (2013). Microwave heating for the rapid generation of glycosylhydrazides. *Bioconjugate Chemistry*, 24(7), 1264-1269. doi :10.1021/bc300667b
- Marcus, S. E., Verherbruggen, Y., Hervé, C., Ordaz-Ortiz, J. J., Farkas, V., Pedersen, H. L., ... Knox, J. P. (2008). Pectic homogalacturonan masks abundant sets of xyloglucan epitopes in plant cell walls. *BMC plant biology*, 8, 60. doi :10.1186/1471-2229-8-60
- Martinez-Duncker, I. (2003). A new superfamily of protein-O-fucosyltransferases, 2-fucosyltransferases, and 6-fucosyltransferases: phylogeny and identification of conserved peptide motifs. *Glycobiology*, 13(12), 1C-5. doi :10.1093/glycob/cwg113
- McFarlane, H. E., Döring, A., & Persson, S. (2014). The cell biology of cellulose synthesis. *Annual review of plant biology*, 65, 69-94. doi :10.1146/annurev-arplant-050213-040240
- Messens, J., & Collet, J.-F. (2006). Pathways of disulfide bond formation in Escherichia coli. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 38(7), 1050-1062. doi :10.1016/j.biocel.2005.12.011
- Miyoshi, E., Moriwaki, K., Terao, N., Tan, C.-C., Terao, M., Nakagawa, T., ... Kamada, Y. (2012). Fucosylation Is a Promising Target for Cancer Diagnosis and Therapy. *Biomolecules*, 2(1), 34-45. doi :10.3390/biom2010034
- Mohnen, D. (2008). Pectin structure and biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*. doi :10.1016/j.pbi.2008.03.006

- Mollay, C., Vilas, U., & Kreil, G. (1982). Cleavage of honeybee prepromelittin by an endoprotease from rat liver microsomes: Identification of intact signal peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 79(April), 2260-2263.
- Monegal, A., & Planas, A. (2006). Chemical rescue of alpha3-galactosyltransferase. Implications in the mechanism of retaining glycosyltransferases. *Journal of the American Chemical Society*, 128(7), 16030-16031. doi :10.1021/ja0659931
- Morgan, J. L. W., Strumillo, J., & Zimmer, J. (2013). Crystallographic snapshot of cellulose synthesis and membrane translocation. *Nature*, 493(7431), 181-6. doi :10.1038/nature11744
- Münster, J., Ziegelmüller, P., Spillner, E., & Bredehorst, R. (2006). High level expression of monomeric and dimeric human  $\alpha$ 1,3- fucosyltransferase V. *Journal of Biotechnology*, 121(4), 448-457. doi :10.1016/j.jbiotec.2005.08.015
- Nettleship, J. E., Assenberg, R., Diprose, J. M., Rahman-Huq, N., & Owens, R. J. (2010). Recent advances in the production of proteins in insect and mammalian cells for structural biology. *Journal of Structural Biology*, 172(1), 55-65. doi :10.1016/j.jsb.2010.02.006
- Oikawa, A., Lund, C. H., Sakuragi, Y., & Scheller, H. V. (2013). Golgi-localized enzyme complexes for plant cell wall biosynthesis. *Trends in plant science*, 18(1), 49-58. doi :10.1016/j.tplants.2012.07.002
- Ollis, A. a, Zhang, S., Fisher, A. C., & DeLisa, M. P. (2014). Engineered oligosaccharyltransferases with greatly relaxed acceptor-site specificity. *Nature chemical biology*, 10(august), 1-9. doi :10.1038/nchembio.1609
- Pak, J. E., Arnoux, P., Zhou, S., Sivarajah, P., Satkunarajah, M., Xing, X., & Rini, J. M. (2006). X-ray crystal structure of leukocyte type core 2  $\beta$ 1,6-N-acetylglucosaminyltransferase: Evidence for a convergence of metal ion-independent glycosyltransferase mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 281(36), 26693-26701. doi :10.1074/jbc.M603534200
- Pak, J. E., Satkunarajah, M., Seetharaman, J., & Rini, J. M. (2011). Structural and mechanistic characterization of leukocyte-type core 2  $\beta$ 1,6-N-acetylglucosaminyltransferase: A metal-ion-independent GT-A glycosyltransferase. *Journal of Molecular Biology*, 414(5), 798-811. doi :10.1016/j.jmb.2011.10.039
- Park, Y. B., & Cosgrove, D. J. (2015). Xyloglucan and its Interactions with Other Components of the Growing Cell Wall. *Plant and Cell Physiology*, 56(January), 180-194. doi :10.1093/pcp/pcu204

- Pedersen, H. L., Fangel, J. U., McCleary, B., Ruzanski, C., Rydahl, M. G., Ralet, M.-C., ... Willats, W. G. T. (2012). Versatile high resolution oligosaccharide microarrays for plant glycobiology and cell wall research. *The Journal of biological chemistry*, 287(47), 39429-38. doi :10.1074/jbc.M112.396598
- Pegan, S., Tian, Y., Sershon, V., & Mesecar, A. (2010). A Universal, Fully Automated High Throughput Screening Assay for Pyrophosphate and Phosphate Release from Enzymatic Reactions. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 13(1), 27-38. doi :10.2174/138620710790218203
- Pena, M. J., Kong, Y., York, W. S., & O'Neill, M. a. (2012). A Galacturonic Acid-Containing Xyloglucan Is Involved in Arabidopsis Root Hair Tip Growth. *The Plant Cell*, 24(11), 4511-4524. doi :10.1105/tpc.112.103390
- Peña, M. J., Ryden, P., Madson, M., Smith, A. C., & Carpita, N. C. (2004). The galactose residues of xyloglucan are essential to maintain mechanical strength of the primary cell walls in Arabidopsis during growth. *Plant physiology*, 134, 443-451. doi :10.1104/pp.103.027508
- Perrin, R. M. (1999). Xyloglucan Fucosyltransferase, an Enzyme Involved in Plant Cell Wall Biosynthesis. *Science*, 284(5422), 1976-1979. doi :10.1126/science.284.5422.1976
- Perrin, R. M., DeRocher, A. E., Bar-Peled, M., Zeng, W., Norambuena, L., Orellana, A., ... Keegstra, K. (1999). Xyloglucan fucosyltransferase, an enzyme involved in plant cell wall biosynthesis. *Science (New York, N.Y.)*, 284(5422), 1976-1979.
- Perrin, R. M., Jia, Z., Wagner, T. A., O'Neill, M. A., Sarria, R., York, W. S., ... Keegstra, K. (2003). Analysis of xyloglucan fucosylation in Arabidopsis. *Plant physiology*, 132(2), 768-778. doi :10.1104/pp.102.016642
- Persson, M., & Palcic, M. M. (2008). A high-throughput pH indicator assay for screening glycosyltransferase saturation mutagenesis libraries. *Analytical Biochemistry*, 378(1), 1-7. doi :10.1016/j.ab.2008.03.006
- Petersen, B. L., Egelund, J., Damager, I., Faber, K., Krüger Jensen, J., Yang, Z., ... Ulvskov, P. (2009). Assay and heterologous expression in *Pichia pastoris* of plant cell wall type-II membrane anchored glycosyltransferases. *Glycoconjugate Journal*, 26, 1235-1246. doi :10.1007/s10719-009-9242-0
- Pogorelko, G., Lionetti, V., Bellincampi, D., & Zabolina, O. (2013). Cell wall integrity: Targeted post-synthetic modifications to reveal its role in plant growth and defense against pathogens. *Plant Signaling & Behavior*, 8(September), e25435. doi :10.4161/psb.25435

- Pu, Q., & Yu, C. (2014). Glycosyltransferases, glycosylation and atherosclerosis. *Glycoconjugate journal*, 31(9), 605-11. doi :10.1007/s10719-014-9560-8
- Qasba, P. K., Ramakrishnan, B., & Boeggeman, E. (2005). Substrate-induced conformational changes in glycosyltransferases. *Trends in Biochemical Sciences*, 30(1), 53-62. doi :10.1016/j.tibs.2004.11.005
- Radford, K. M., Cavegn, C., Bertrand, M., Bernard, A. R., Reid, S., & Greenfield, P. F. (1997). The indirect effects of multiplicity of infection on baculovirus expressed proteins in insect cells: Secreted and non-secreted products. *Cytotechnology*, 24(1), 73-81. doi :10.1023/A:1007962903435
- Raran-Kurussi, S., & Waugh, D. S. (2012). The Ability to Enhance the Solubility of Its Fusion Partners Is an Intrinsic Property of Maltose-Binding Protein but Their Folding Is Either Spontaneous or Chaperone-Mediated. *PLoS ONE*, 7(11). doi :10.1371/journal.pone.0049589
- Rausch, M., Pörtner, R., & Knäblein, J. (2013). Increase of Protein Yield in High Five Cells in a Single-Use Perfusion Bioreactor by Medium Replacement. *Chemie Ingenieur Technik*, 85(1-2), 111-117. doi :10.1002/cite.201200121
- Rich, R. L., Papalia, G. a, Flynn, P. J., Furneisen, J., Quinn, J., Klein, J. S., ... Myszk, D. G. (2009). A global benchmark study using affinity-based biosensors. *Analytical biochemistry*, 386(2), 194-216. doi :10.1016/j.ab.2008.11.021
- Ring, S. G., & Selvendran, R. (1981). An arabinogalactoxyloglucan from the cell wall of *Solanum tuberosum*. *Phytochemistry*, 20(11), 2511-2519.
- Saribas, a. S., Johnson, K., Liu, L., Bezila, D., & Hakes, D. (2007). Refolding of human ??-1-2 GlcNAc transferase (GnT1) and the role of its unpaired Cys 121. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 362(2), 381-386. doi :10.1016/j.bbrc.2007.07.199
- Saxena, I. M., & Brown, R. M. (2005). Cellulose biosynthesis: Current views and evolving concepts. *Annals of Botany*, 96(1), 9-21. doi :10.1093/aob/mci155
- Serna, S., Yan, S., Martin-Lomas, M., Wilson, I. B. H., & Reichardt, N. C. (2011). Fucosyltransferases as synthetic tools: Glycan array based substrate selection and core fucosylation of synthetic N-glycans. *Journal of the American Chemical Society*, 133(41), 16495-16502. doi :10.1021/ja205392z
- Side, X., Substituents, C., Schultink, A., Cheng, K., Park, Y. B., Cosgrove, D. J., & Pauly, M. (2013). The Identification of Two Arabinosyltransferases from Tomato Reveals Functional Equivalency of, 163(September), 86-94. doi :10.1104/pp.113.221788

- Silipo, A., Larsbrink, J., Marchetti, R., Lanzetta, R., Brumer, H., & Molinaro, A. (2012). NMR spectroscopic analysis reveals extensive binding interactions of complex xyloglucan oligosaccharides with the *Cellvibrio japonicus* glycoside hydrolase family 31 ??-xylosidase. *Chemistry - A European Journal*, 18(42), 13395-13404. doi :10.1002/chem.201200488
- Smith, G. E., Ju, G., Ericson, B. L., Moschera, J., Lahm, H. W., Chizzonite, R., & Summers, M. D. (1985). Modification and secretion of human interleukin 2 produced in insect cells by a baculovirus expression vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(24), 8404-8408.
- Smith, G. E., Summers, M. D., & Fraser, M. J. (1983). Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Molecular and cellular biology*, 3(12), 2156-2165. doi :10.1128/MCB.3.12.2156.Updated
- Soding, J., Biegert, a., & Lupas, a. N. (2005). The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. *Nucleic Acids Research*, 33(Web Server), W244-W248. doi :10.1093/nar/gki408
- Søgaard, C., Stenbæk, A., Bernard, S., Hadi, M., Driouich, A., Scheller, H. V., & Sakuragi, Y. (2012). GO-PROMTO illuminates protein membrane topologies of glycan biosynthetic enzymes in the Golgi apparatus of living tissues. *PLoS ONE*, 7(2), 1-12. doi :10.1371/journal.pone.0031324
- Spadiut, O., Ibatullin, F. M., Peart, J., Gullfot, F., Martinez-Fleites, C., Ruda, M., ... Brumer, H. (2011). Building custom polysaccharides in vitro with an efficient, broad-specificity xyloglucan glycosynthase and a fucosyltransferase. *Journal of the American Chemical Society*, 133(28), 10892-10900. doi :10.1021/ja202788q
- Tan, L., Eberhard, S., Pattathil, S., Warder, C., Glushka, J., Yuan, C., ... Mohnen, D. (2013). An Arabidopsis cell wall proteoglycan consists of pectin and arabinoxylan covalently linked to an arabinogalactan protein. *The Plant cell*, 25(1), 270-87. doi :10.1105/tpc.112.107334
- Tessier, D., Thomas, D., Khouri, H., Laliberté, F., & Vernet, T. (1991). Enhanced secretion from insect cells of a foreign protein fused to the honeybee melittin signal peptide. *Gene*, 15(98(2)), 177-83.
- Thibodeaux, C. J., Melançon, C. E., & Liu, H. (2007). Unusual sugar biosynthesis and natural product glycodiversification. *Nature*, 446(7139), 1008-16. doi :10.1038/nature05814
- Thompson, J. E., Smith, R. C., & Fry, S. C. (1997). Isopycnic Centrifugation in Caesium Trifluoroacetate. *Pharmacia*, 708, 699-708.

- Thuan, N. H., & Sohng, J. K. (2013). Recent biotechnological progress in enzymatic synthesis of glycosides. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 40(12), 1329-1356. doi :10.1007/s10295-013-1332-0
- Tu, Z., Lin, Y.-N., & Lin, C.-H. (2013). Development of fucosyltransferase and fucosidase inhibitors. *Chemical Society reviews*, 42(10), 4459-75. doi :10.1039/c3cs60056d
- Vanzin, G. F., Madson, M., Carpita, N. C., Raikhel, N. V, Keegstra, K., & Reiter, W. (2002). The mur2 mutant of *Arabidopsis thaliana* lacks fucosylated xyloglucan because of a lesion in fucosyltransferase AtFUT1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. doi :10.1073/pnas.052450699
- Voxeur, A., André, A., Breton, C., & Lerouge, P. (2012). Identification of putative rhamnogalacturonan-II specific glycosyltransferases in *Arabidopsis* using a combination of bioinformatics approaches. *PloS one*, 7(12), e51129. doi :10.1371/journal.pone.0051129
- Vrielink, a, Rüger, W., Driessen, H. P., & Freemont, P. S. (1994). Crystal structure of the DNA modifying enzyme beta-glucosyltransferase in the presence and absence of the substrate uridine diphosphoglucose. *The EMBO journal*, 13(15), 3413-3422.
- Vuttipongchaikij, S., Brocklehurst, D., Steele-King, C., Ashford, D. A., Gomez, L. D., & Mcqueen-Mason, S. J. (2012). *Arabidopsis* GT34 family contains five xyloglucan  $\alpha$ -1,6-xylosyltransferases. *New Phytologist*, 195(3), 585-595. doi :10.1111/j.1469-8137.2012.04196.x
- Wagner, G. K., & Pesnot, T. (2010). Glycosyltransferases and their assays. *Chembiochem : a European journal of chemical biology*, 11(14), 1939-49. doi :10.1002/cbic.201000201
- Williams, G. J., Goff, R. D., Zhang, C., & Thorson, J. S. (2008). Optimizing Glycosyltransferase Specificity via « Hot Spot » Saturation Mutagenesis Presents a Catalyst for Novobiocin Glycorandomization. *Chemistry and Biology*, 15(4), 393-401. doi :10.1016/j.chembiol.2008.02.017
- Williams, G. J., Zhang, C., & Thorson, J. S. (2007). Expanding the promiscuity of a natural-product glycosyltransferase by directed evolution. *Nature chemical biology*, 3(10), 657-662. doi :10.1038/nchembio.2007.28
- Wolf, S., Hématy, K., & Höfte, H. (2012). Growth Control and Cell Wall Signaling in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 63, 381-407. doi :10.1146/annurev-arplant-042811-105449
- Wongkongkatep, J., Miyahara, Y., Ojida, A., & Hamachi, I. (2006). Label-free, real-time

- glycosyltransferase assay based on a fluorescent artificial chemosensor. *Angewandte Chemie - International Edition*, 45(4), 665-668. doi :10.1002/anie.200503107
- Worden, N., Park, E., & Drakakaki, G. (2012). Trans-Golgi Network-An Intersection of Trafficking Cell Wall Components. *Journal of Integrative Plant Biology*, 54(11), 875-886. doi :10.1111/j.1744-7909.2012.01179.x
- Wu, Z. L., Ethen, C. M., Prather, B., MacHacek, M., & Jiang, W. (2011). Universal phosphatase-coupled glycosyltransferase assay. *Glycobiology*, 21(6), 727-733. doi :10.1093/glycob/cwq187
- Xiao, J., Muzashvili, T. S., & Georgiev, M. I. (2014). Advances in the biotechnological glycosylation of valuable flavonoids. *Biotechnology advances*, 32(6), 1145-1156. doi :10.1016/j.biotechadv.2014.04.006
- Xiao, S., Shiloach, J., & Betenbaugh, M. J. (2014). Engineering cells to improve protein expression. *Current Opinion in Structural Biology*, 26(1), 32-38. doi :10.1016/j.sbi.2014.03.005
- Xiao, S., White, J. F., Betenbaugh, M. J., Grisshammer, R., & Shiloach, J. (2013). Transient and Stable Expression of the Neurotensin Receptor NTS1: A Comparison of the Baculovirus-Insect Cell and the T-REx-293 Expression Systems. *PLoS ONE*, 8(5). doi :10.1371/journal.pone.0063679
- Xu, C., Spadiut, O., Araújo, A. C., Nakhai, A., & Brumer, H. (2012). Chemo-enzymatic assembly of clickable cellulose surfaces via multivalent polysaccharides. *ChemSusChem*, 5(4), 661-665. doi :10.1002/cssc.201100522
- York, W. S., Darvill, a G., & Albersheim, P. (1984). Inhibition of 2,4-dichlorophenoxyacetic Acid-stimulated elongation of pea stem segments by a xyloglucan oligosaccharide. *Plant physiology*, 75(2), 295-297. doi :10.1104/pp.75.2.295
- Zeng, W., Jiang, N., Nadella, R., Killen, T. L., Nadella, V., & Faik, A. (2010). A glucurono(arabino)xylan synthase complex from wheat contains members of the GT43, GT47, and GT75 families and functions cooperatively. *Plant physiology*, 154(1), 78-97. doi :10.1104/pp.110.159749
- Zhang, Q., Brumer, H., Ågren, H., & Tu, Y. (2011). The adsorption of xyloglucan on cellulose: Effects of explicit water and side chain variation. *Carbohydrate Research*, 346(16), 2595-2602. doi :10.1016/j.carres.2011.09.007
- Zhou, Q., Brumer, H., & Teeri, T. T. (2009). Self-organization of cellulose nanocrystals

adsorbed with xyloglucan oligosaccharide-poly (ethylene glycol)-polystyrene triblock copolymer. *Macromolecules*, 42(15), 5430-5432. doi :10.1021/ma901175j

## Annexe I : Alignements de séquences protéiques FuT, famille GT37

Séquences FuT1 à FuT10 d'*Arabidopsis thaliana* et FuT1 de *Pisum sativum*.

Les cystéines sont surlignées en jaune, les acides aminés d'AtFuT1 impliqués dans la liaison avec les substrats sont en gras : rouge pour ceux qui interagissent avec le GDP et bleu avec l'accepteur XLG. Les trois motifs peptidique I, II, III conservés parmi les GTs sont soulignés pour AtFuT1. AtFuT3 ne possède pas le motif I et AtFuT9 ne possède pas le motif II.

```
tr|Q56YH9|FuT3_ARATH      -----MMKPSLSSMKTMGLLLAVLMVASVM
sp|O81053|FUT2_ARATH      -----MRITEILA-LFMVLVPVSLV
sp|Q9M5Q1|FUT1_PEA        --MNMLIKRVIAIKNPRGDDNNNNKLSDLTLTDKCTTCPLTLMRVMAFFVVSFMLFSVL
sp|Q9SWH5|FUT1_ARATH      MDQNSYRRRSSPIRTTTGGSKSVNFSELLQM----KYLSSGTMKLTFTFTTCLIVFSVL
sp|Q9XI77|FUT9_ARATH      -----MIKLTIAIATCLVLCVLV
sp|Q9XI78|FUT8_ARATH      -----MKV-VITVVTCLFLLSVM
sp|Q9XI81|FUT7_ARATH      -----MKTKL-MITIFSCLLLWSML
sp|Q9SJP4|FUT5_ARATH      -----MYQKFQISGKIVKTLGLKMKVLIASVFGSLLF----
sp|Q9SJP6|FUT10_ARATH     -----MKILIAVVFGCLLI----
sp|Q9SJP2|FUT4_ARATH      -----MYHIFQISGEVIKGLGLKTKILITIVFSTLLILSVM
sp|Q9XI80|FUT6_ARATH      -----MYHIFQISSEVFRAFGLKMKILLTLVFSGLLIWSVV
```

∴

```
tr|Q56YH9|FuT3_ARATH      --FSLSVVLRDPPSDDVIETEAAS----RVLQSR LHQDGG--LSEKKAQLGNINLVPSFD
sp|O81053|FUT2_ARATH      IVAMFGYDQGNFVQASRFITMEPNVTSSSDSSLVQRDQEQKDSVMSLLGGLLVSGFK
sp|Q9M5Q1|FUT1_PEA        --FSLSVVLRDPPSDAAISST-T---TLFQLNQGLGSDDFDSVELLNDKLLGGLLADGFD
sp|Q9SWH5|FUT1_ARATH      --VAFSMIFHQHPSDSNRIMGFA---EARVLDAGVF---PNVTNINSDKLLGGLLASGFD
sp|Q9XI77|FUT9_ARATH      -LLPSSNISYRHKYDLPTN-----G---LNDSEQQSEKLLGGLLATGFE
sp|Q9XI78|FUT8_ARATH      -QLSFFNIFNYQLLDATTN-----G---SKDSRKS KD KLLGGLLTADF
sp|Q9XI81|FUT7_ARATH      LLSFSFNIFKHQLLGATIN-----VG---SKDSVKPRDRLGGLLTADF
sp|Q9SJP4|FUT5_ARATH      -ILSYSNNFNKLLDATTK-----VD---IKETEKPVDKLIGGLLTADF
sp|Q9SJP6|FUT10_ARATH     -ILSFSKYFNDQLLDATT-----KD---IKESERPVDK LIGGLLTADF
sp|Q9SJP2|FUT4_ARATH      -LLSFSNNFNKLF AATIN-----D---ES-ETPGDR LIGGLLTADF
sp|Q9XI80|FUT6_ARATH      -LVSFSNDFNNQLLVATSN-----V---SRESETPRDRLIGGLLTADF
```

\* \* \*

```
tr|Q56YH9|FuT3_ARATH      KESCLSRYEASLYRKESPFKQSSYLDYRLQRYEDLHRRCGPFTRSYNLTLDKLSGDR-
sp|O81053|FUT2_ARATH      KESCLSRYQS-YLYRKASPYKPSLHLLSKL RAYEELHKRCGPGTRQYTNAERLLKQKQT-
sp|Q9M5Q1|FUT1_PEA        EKSCLSRYQS-AIFGKGLSGKPSSYLISRLRKYEARHKQCGPYTESYNKTVKELGSG--
sp|Q9SWH5|FUT1_ARATH      EDSCLSRYQS-VHYRKPSPYKPSSYLISKLRNYEKLHKRCGPGTESYK KALKQLDQE---
sp|Q9XI77|FUT9_ARATH      EKSCLSRYDQS--MSKPSPYKPSRHIVSKLRSYEMLHKRCGPGTKAYKRATKQLGHNE--
sp|Q9XI78|FUT8_ARATH      EDSCLSRYES-SLYRKPSPYKPSRYLVSKLRSYEMLHKRCGPGTEAYKKATEILGHDDEN
sp|Q9XI81|FUT7_ARATH      EDSCLSRYQS-SLYRKPSPYRTSEYLISKLRNYEMLHKRCGPGTDAYKRATEKLGHDDEN
sp|Q9SJP4|FUT5_ARATH      EGSCLSRYHKYFLYRKPSPYKPSEYLVSKLRSYEMLHKRCGPDTEYYKEAIEKLSRD-D-
sp|Q9SJP6|FUT10_ARATH     EGSCLSRYHKYFLYRKPSPYMPSEYLVSELRSYEMLHKRCGPDTKAYKEATEKLSRD-EY
sp|Q9SJP2|FUT4_ARATH      EGSCLSRYHKTFLYRKPSPYKPSEYLVSKLRSYEMLHKRCGPGTKAYKEATKHLSDENY
sp|Q9XI80|FUT6_ARATH      EGSCLSRYQQSLLYRKASPYKPSEYLVSKLRSYEMLHKRCGPGTDAYKKATEILGHDDEN
```

: \*\*\*\*\* \* \* : .\*: \*\* \*:\*\*\* \* \* : \*

|                       |                                                         |                                                 |
|-----------------------|---------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| tr Q56YH9 FuT3_ARATH  | -SDGEVSGCRYVIWLSNGDLGNRMLSLASAFLYALLTNRFLLEVELGVDMADLFC | CEPFPN                                          |
| sp O81053 FUT2_ARATH  | -GEMESQGC                                               | KYVWMSFSG-LGNRIISIASVFLYAMLTDRVLLVEGGEQFADLFC   |
| sp Q9M5Q1 FUT1_PEA    | -QFSESVD                                                | CKYVWISFSG-LGNRIITLVS                           |
| sp Q9SWH5 FUT1_ARATH  | -HIDGDGEC                                               | KYVWISFSG-LGNRILSLASVFLYALLTDRVLLVDRGKDMDDLFC   |
| sp Q9XI77 FUT9_ARATH  | -LSSSGDE                                                | CRYVWMPMFG-LGNRMLSLVSVFLYALLTDRVMLVDQRNDITDLFC  |
| sp Q9XI78 FUT8_ARATH  | HSTKSVGEC                                               | RYIVWIAVYG-LGNRIITLASFLYALLTDRIMLVDQRTDISDLFC   |
| sp Q9XI81 FUT7_ARATH  | VGDSSDGE                                                | CKYIVWVAVYG-LGNRIITLASVFLYALLTERIILVDQRKDISDLFC |
| sp Q9SJP4 FUT5_ARATH  | -ASESNGEC                                               | RYIVWVAGYG-LGNRLITLASVFLYALLTERIILVDNRKDVSDLLC  |
| sp Q9SJP6 FUT10_ARATH | YASESNGEC                                               | RYIVWLARDG-LGNRLITLASVFLYAILTERIILVDNRKDVSDLLC  |
| sp Q9SJP2 FUT4_ARATH  | NASKSDGE                                                | CRYVWLADYG-LGNRLITLASVFLYALLTDRIILVDNRKDIGDLLC  |
| sp Q9XI80 FUT6_ARATH  | YASKSVGEC                                               | RYIVWVAVYG-LGNRIITLASVFLYALLTERVVLVDQSKDISDLFC  |

\*:~::~~: \* ~~~~::~~.~ ~~~~::~~.~.~::~~: ~. ~::~~

|                       |                                                        |
|-----------------------|--------------------------------------------------------|
| tr Q56YH9 FuT3_ARATH  | TTWFLPPEFPLNSH--F---NE-----QSLLRNSG----NPMVAYRHVVRDSSD |
| sp O81053 FUT2_ARATH  | TTWLLPKDFTLASQ--FSGFGQNSAHC                            |
| sp Q9M5Q1 FUT1_PEA    | ASWFVPPDFPLNSH--LNNFNQESNQ                             |
| sp Q9SWH5 FUT1_ARATH  | MSWLLPLDFPMTDQ--FDGLNQESSRC                            |
| sp Q9XI77 FUT9_ARATH  | TSWLLPLDFPLNDQ--LDSFNREHSRC                            |
| sp Q9XI78 FUT8_ARATH  | TSWLLPLDFPLTDQ--LDSFNKESPRC                            |
| sp Q9XI81 FUT7_ARATH  | TSWLLPLDFPLMGQ--IDSFNREYSHC                            |
| sp Q9SJP4 FUT5_ARATH  | TSWLLPLDFPMLNITYAWGYNKEYPRC                            |
| sp Q9SJP6 FUT10_ARATH | TSWLLPLDFPMLNITYAYGYNKEYPRC                            |
| sp Q9SJP2 FUT4_ARATH  | TSWLLPLDFPLMKY--ADGYHKGYSRC                            |
| sp Q9XI80 FUT6_ARATH  | TSWLLPLEFPLMKQ--IDGYNKGYSRC                            |

:~::~~ ~: . :

|                       |         |                                                        |
|-----------------------|---------|--------------------------------------------------------|
| tr Q56YH9 FuT3_ARATH  | QQKLFFC | EDSQVLLEETPWLILKADSFFLPSLFSVSSFKQELQMLFPEKDTAFHFLSQYL  |
| sp O81053 FUT2_ARATH  | HDKMFFC | EEDQNLLKNVPWLIMRTNFFAPSLFLISSFEEELGMMFPEKGTVFHHLGRYL   |
| sp Q9M5Q1 FUT1_PEA    | HDKLFFC | DEEQFLQNVPLLMKTDNYFIPSLFLMPSFEQELNDLFPKKEKVHFLGRYL     |
| sp Q9SWH5 FUT1_ARATH  | HDKMFFC | EGDQTFIGKVPWLIVKTDNYFVPSLWLIPGFDDELNKLFPQKATVFHHLGRYL  |
| sp Q9XI77 FUT9_ARATH  | HDKKFFC | EEDQAFLDKVTWLVVKSNLVYFVPSLWMI                          |
| sp Q9XI78 FUT8_ARATH  | YDKMFFC | ESDQILIRQVPWLVFNSNLVYFIPSLWLIPSFQSELSKLFQKETVFHHLARYL  |
| sp Q9XI81 FUT7_ARATH  | QDKMFFC | QKDQSLVDKVPWLIVVKSNLVYFIPSLWLNPSFQTELIKLFQKDTVFYHLARYL |
| sp Q9SJP4 FUT5_ARATH  | SDKLFVC | QKDQSLIDKVPWLIVQANVYFVPSLWLNPTFQTELVKLFQKETVFHHLARYL   |
| sp Q9SJP6 FUT10_ARATH | SDKLFFC | QKDQSFIDKVPWLIQTNAYFVPSLWLNPTFQTKLVKLFQKETVFHHLARYL    |
| sp Q9SJP2 FUT4_ARATH  | SDKMFFC | QKDQSLIDKVPWLIFRANVYFVPSLWLNPTFQTELTCLFPQKETVFHHLGRYL  |
| sp Q9XI80 FUT6_ARATH  | NDKMFFC | QKDQSLVDKVPWLIVKANVYFVPSLWLNPTFQTELMKLFQKEAVFHHLARYL   |

:\* ~::~~.~ ~::~~.~ ~::~~.~ ~::~~.~ ~::~~.~ ~::~~.~ ~::~~.~ ~::~~.~

|                       |                                                     |
|-----------------------|-----------------------------------------------------|
| tr Q56YH9 FuT3_ARATH  | FHPTNVWGLITRYYNAYLAKADQRIGIYIGVSESGNEQFQHLIDQILAC   |
| sp O81053 FUT2_ARATH  | FHPSNQVWGLITRYYQAYLAKADERIGLQIRVFDEKSGVSPRVTKQIIS   |
| sp Q9M5Q1 FUT1_PEA    | LHPTNNVWGLVVRYYDAYLAKVDERIGIQIRVFDTPGPFQHVLDQVLACTL |
| sp Q9SWH5 FUT1_ARATH  | FHPTNQVWGLVTRYEAYLSHADEKIGIQVRVFD                   |
| sp Q9XI77 FUT9_ARATH  | FHPTNQVWGMVTRSYNAYLSRADERLGIQVRVFSKPVGYFQHVMDQIL    |
| sp Q9XI78 FUT8_ARATH  | FHPTNQVWGMITRSYNGYLSRADERLGIQVRVFSKPVGYFQHVMDQILACT |
| sp Q9XI81 FUT7_ARATH  | FHPTNQVWGMVTRSYNAYLSRADEILGIQVRVFSRQTKYFQHVMDQIVACT |
| sp Q9SJP4 FUT5_ARATH  | FHPTNEVWDMVTDYHYAHLKADERLGIQIRVFGKPDGRFKHVIDQVISCT  |
| sp Q9SJP6 FUT10_ARATH | FHPTNEVWDMVTKYDAHLNADERLGIQIRVFGKPSGYFKHVMDQVVACT   |
| sp Q9SJP2 FUT4_ARATH  | FHPKNQVWDIVTKYYHDHLSKADERLGIQIRVFRDQGGYYQHVMDQVISCT |

|                       |                                                                                                                    |
|-----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| sp Q9XI80 FUT6_ARATH  | FHPTNQVWGLITRSYNAYLSRADETLGIQIRVFSDRAGYFQHVMDQVVA <b>CT</b> TRENLLPEP<br>:*. * ** :. . *. :*:.*: :*: : * :. .*:    |
| tr Q56YH9 FuT3_ARATH  | DKQRNLPS-SQVLNRKSKAVFISSSSPGYFKSIRDVYWENPTVMGEIISVHKPSYKDYQK                                                       |
| sp O81053 FUT2_ARATH  | SKGEEQYKQPSEEELKLKSVLVTSLTTGYFEILKTMWENPTVTRDVIGIHQPSHEGHQQ                                                        |
| sp Q9M5Q1 FUT1_PEA    | NR--EQNINSSSGTPKSKAVLITSLSSGYFEKVRDMYWEFPTETGEVVGIIYQPSHEGYQQ                                                      |
| sp Q9SWH5 FUT1_ARATH  | DTLVERS--RHVNTPKHKAVLVT <b>SL</b> NAGYAENLKSMYWEYPTSTGEIIGVHQPSQEGYQQ                                              |
| sp Q9XI77 FUT9_ARATH  | -----YSDHLKNMFLEQASSTGETIEVYQPSGEKIQQ                                                                              |
| sp Q9XI78 FUT8_ARATH  | FVL-ETQVTNTSRSSKLKAVLVTSLYPEYSEILRQMYWKGPSSTGEI IQIYQPSQEIIYQQ                                                     |
| sp Q9XI81 FUT7_ARATH  | AAQEAAQVTNTSNPSKLKAVLVTSLNPEYSNNLKKMYWEHPTTTGDIVEVYQPSRERFQQ                                                       |
| sp Q9SJP4 FUT5_ARATH  | ATPEESKV-NISKTPKLKSVLVASLYPEFSGNLTNMFSCRPSSTGEIVEVYQPSGERVQQ                                                       |
| sp Q9SJP6 FUT10_ARATH | E--EESKV-NISKPPKLKVVLVASLYPEYSVNLTNMFLARPSSTGEIEVYQPSAERVQQ                                                        |
| sp Q9SJP2 FUT4_ARATH  | ATQEESKV-NISNIPKSKAVLVTSLSPEYSKKLENMFSEANMTGEIKVYQPSGERYQQ                                                         |
| sp Q9XI80 FUT6_ARATH  | AAQEEP KV-NISRSQKLKAVLVTSLYPEYSETLKNMYWERPSSTGEIEVYQPSGERVQQ<br>: : :. : : :*: : *                                 |
| tr Q56YH9 FuT3_ARATH  | TPRNMESKRAWAEIYLLS <b>C</b> SDALVVTGLWSSSLVEVAHGLGGLKPWVLNKAENGTAHEPY <b>C</b>                                     |
| sp O81053 FUT2_ARATH  | TEKLMHNRKAWAEMYLLSLTDKLV-ISAWSTFGYVAQGLGGLRAWILYKQENQTNPNPP <b>C</b>                                               |
| sp Q9M5Q1 FUT1_PEA    | TQKQFHNQKAWAEMYLLSLTDVLV-TSSWSTFGYVAQGLGGLKPWILYKPENRTAPNPP <b>C</b>                                               |
| sp Q9SWH5 FUT1_ARATH  | TEKKMHNGKALA <b>E</b> MYLLSLTDNLV-TSAW <b>ST</b> FGYVAQGLGGLKPWILYRPNRTTPDP <b>S</b>                               |
| sp Q9XI77 FUT9_ARATH  | TDKKLHDQKALAEIYLLSLTDLV-TSTRSTFGYVAQGLGGLKPWILYEPDKKTPNPP <b>C</b>                                                 |
| sp Q9XI78 FUT8_ARATH  | TDNKLHDQKALAEIYLLSLTDYIV-TSDSSTFGYVAQGLGGLKPWILYKPKNHTAPEPP <b>C</b>                                               |
| sp Q9XI81 FUT7_ARATH  | TDKKLHDQKALAEIYLLSLTDKLV-TSALSTFGYVAQGLGGLKPWILYTPKKFKSPNPP <b>C</b>                                               |
| sp Q9SJP4 FUT5_ARATH  | TDKKSHDQKALAEIYLLSLTDNIV-TSARSTFGYVSYSLGGLKPWLLYQPTNFTTPNPP <b>C</b>                                               |
| sp Q9SJP6 FUT10_ARATH | TDKKSHDQKALAEIYLLSLTDNIV-TSGWSTFGYVSYSLGGLKPWLLYQPVNFTTPNPP <b>C</b>                                               |
| sp Q9SJP2 FUT4_ARATH  | TDKKVHDQKALAEIYLLSLTDNIV-ASSRSTFGYVAYSLGGLKPWLLYLPNDNKAPDP <b>P</b>                                                |
| sp Q9XI80 FUT6_ARATH  | TDKKLHDQKALAEIYLLSLTDKIV-TSARSTFGYVAHSLGGLKPWLLYQPTGPTAPDP <b>P</b><br>* . . : * ** :* :* . * : : * : . :* : * : * |
| tr Q56YH9 FuT3_ARATH  | VKARSIEP <b>C</b> SQATLFHG <b>C</b> KD-----                                                                        |
| sp O81053 FUT2_ARATH  | GRAMSPDP <b>C</b> FHAPPYYD <b>C</b> KA-KKGTDTGNVVPVVRH <b>C</b> EDIS-WGLKLVDNF----                                 |
| sp Q9M5Q1 FUT1_PEA    | GRAMSMEP <b>C</b> FHAPPFYD <b>C</b> KA-KRGTDTGALVPHVRH <b>C</b> EDMS-WGLKLVDN----                                  |
| sp Q9SWH5 FUT1_ARATH  | GRAMSMEP <b>C</b> F <b>H</b> SPPFYD <b>C</b> KA-KTGIDTGTLPVPHVRH <b>C</b> EDIS-WGLKLV-----                         |
| sp Q9XI77 FUT9_ARATH  | VRAMSMEP <b>C</b> FLRAPLHG <b>C</b> QAKT-----IKIPPFVRI <b>C</b> EDWK-TGLKLVDVSD <b>E</b> L-                        |
| sp Q9XI78 FUT8_ARATH  | VRAVSMEP <b>C</b> FLRAPLYG <b>C</b> QAKK-----VNITPFVMY <b>C</b> EDRI-TGLKLVD <b>S</b> N----                        |
| sp Q9XI81 FUT7_ARATH  | GRVISMEP <b>C</b> FLTPPVHG <b>C</b> EA-KKGINTAKIVPFVRH <b>C</b> EDLRHYGLKLVD <b>D</b> TKNEL                        |
| sp Q9SJP4 FUT5_ARATH  | VRKSMEP <b>C</b> YLTPPSHG <b>C</b> EA-DWGTNSGKILPFVRH <b>C</b> EDLIYGGLKLY <b>D</b> EF----                         |
| sp Q9SJP6 FUT10_ARATH | VRKSMEP <b>C</b> YHTPPSHG <b>C</b> EA-DWGTNSGKILPFVRH <b>C</b> EDMMYGGLKLY <b>D</b> DF----                         |
| sp Q9SJP2 FUT4_ARATH  | VRSTSMEP <b>C</b> FLTPPTHG <b>C</b> EPDAWG <b>T</b> ESGKVVPFVR <b>I</b> <b>C</b> EDI--WGLKL <b>F</b> DEL----       |
| sp Q9XI80 FUT6_ARATH  | IQSTSMDP <b>C</b> HLTTPPSHG <b>C</b> EP-EWGTNSGKVVPFVRH <b>C</b> EDRGNDGLKL <b>F</b> DEL----<br>: * :* : *         |

