



**HAL**  
open science

# Caractérisation protéomique et structurale d'endosulfatases humaines Hsulfs modulant la sulfatation de l'héparane sulfate et biomarqueur de progression tumorale

Mélanie Bilong

► **To cite this version:**

Mélanie Bilong. Caractérisation protéomique et structurale d'endosulfatases humaines Hsulfs modulant la sulfatation de l'héparane sulfate et biomarqueur de progression tumorale. Biologie cellulaire. Université Paris-Saclay, 2022. Français. NNT : 2022UPASL007 . tel-03627160

**HAL Id: tel-03627160**

**<https://theses.hal.science/tel-03627160>**

Submitted on 1 Apr 2022

**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.

# Caractérisation protéomique et fonctionnelle de la 6-O-endosulfatase humaine HSulf-2

*Proteomic and functional characterization of the human 6-O-  
endosulfatase HSulf-2*

## Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 577, Structure et Dynamique des Systèmes Vivants (SDSV)  
Spécialité de doctorat : Sciences de la vie et de la santé  
Graduate School : life sciences and health. Référent : Université d'Évry Val d'Essonne

Thèse préparée dans l'unité de recherche **Université Paris-Saclay, Univ Evry, CNRS, LAMBE, 91025, Evry-Courcouronnes, France**, sous la direction de **Régis DANIEL**, directeur de recherche, et la co-direction de **Florence GONNET**, professeure

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 27 janvier 2022, par

**Mélanie BILONG**

## Composition du Jury

|  |                            |
|--|----------------------------|
| <b>Sylvie RICARD-BLUM</b><br>Professeure, Université Lyon 1 – ICBMS (UMR 5246)                   | Présidente &<br>Rapporteur |
| <b>Emmanuelle SACHON</b><br>Maîtresse de conférence HDR, Sorbonne Université – LBM (UMR 7203)    | Rapporteur                 |
| <b>Julia CHAMOT-ROOKE</b><br>Directrice de recherche CNRS, Institut Pasteur – UTECHS (USR 2000)  | Examinatrice               |
| <b>Christine LE NARVOR</b><br>Directrice de recherche CNRS, Institut Pasteur – UTECHS (USR 2000) | Examinatrice               |
| <b>Régis DANIEL</b><br>Directeur de recherche CNRS, UEVE – LAMBE (UMR 8587)                      | Directeur de thèse         |
| <b>Florence GONNET</b><br>Professeure, UEVE – LAMBE (UMR 8587)                                   | Co-Directrice de<br>thèse  |



## Table des matières

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 1     | Liste des abréviations.....  | 4  |
| 2     | Liste des figures .....  | 6  |
| 3     | Liste des tableaux.....  | 10 |
| 4     | Introduction générale et objectif de la thèse .....  | 11 |
|       | Chapitre 1 : Introduction .....  | 13 |
| 5     | HSulfs, 20 ans d’histoire de ces enzymes uniques.....  | 14 |
| 5.1   | Les sulfatases .....   | 14 |
| 5.2   | La découverte d’une nouvelle sulfatase.....  | 17 |
| 5.3   | Les HSulfs, enzymes aux rôles biologiques complexes .....  | 21 |
| 5.3.1 | Les Sulfs, protéines du développement .....  | 21 |
| 5.3.2 | HSulf-1, un rôle suppresseur de tumeur nuancé .....  | 23 |
| 5.3.3 | HSulf-2, une enzyme pro-oncogène ?.....  | 25 |
| 5.3.4 | Autres pathologies associées .....   | 28 |
| 5.4   | Une structure difficile à caractériser.....  | 31 |
| 5.5   | L’importance des domaines dans l’activité enzymatique.....   | 36 |
| 5.5.1 | Une double activité, endosulfatase et arylsulfatase .....  | 36 |
| 5.5.2 | Le rôle du domaine hydrophile .....  | 38 |
| 5.5.3 | Rôle du site catalytique.....  | 40 |
| 6     | Et aujourd’hui ? Objectif de thèse .....   | 42 |
| 6.1   | Caractérisation des modifications post-traductionnelles .....  | 42 |
| 6.2   | La <i>N</i> -glycosylation .....   | 42 |
| 6.3   | Les ponts disulfure.....   | 43 |
| 6.4   | Une modification unique découverte, un glycosaminoglycane.....   | 43 |
| 6.5   | Particularité du modèle d’HSulf-2 étudié.....  | 45 |
| 7     | Chapitre 2 : Caractérisation structurale d’une modification post-traductionnelle<br>unique de HSulf-2 : une chaîne de glycosaminoglycane ..... | 47 |
| 7.1   | Mise en évidence et caractérisation de la structure de liaison HSulf-2/GAG .....   | 48 |
| 7.2   | Identification du type de glycosaminoglycane .....   | 56 |
| 7.3   | Digestion de la chondroïtine par la hyaluronidase-4.....   | 58 |



|        |  |     |
|--------|--|-----|
| 7.3.1  | Mise au point de la dépolymérisation des CS par HYAL-4 analysée par C-PAGE                                   | 60  |
| 7.3.2  | Mise au point de la dépolymérisation des CS par HYAL-4, analysée par exclusion stérique                      | 61  |
| 7.3.3  | Analyse par MS des fractions obtenues par SEC  | 63  |
| 7.4    | Caractérisation fine de la composition en chondroïtine de la chaîne de GAG par RMN                           | 68  |
| 7.4.1  | Mise au point de l'analyse de chondroïtine par RMN   | 69  |
| 7.4.2  | Analyse RMN de la dépolymérisation de HSulf-2 par HYAL-4   | 72  |
| 7.5    | Conclusion   | 75  |
| 8      | Chapitre 3 : Caractérisation protéomique fine de HSulf-2 : Élucidation des N-glycanes et des ponts disulfure | 78  |
| 8.1    | N-glycosylation de HSulf-2   | 79  |
| 8.1.1  | Identification des positions des N-glycanes par LC/MSMS (CID/ETD)  | 80  |
| 8.1.2  | Elucidation des structures des N-glycanes  | 88  |
| 8.2    | Analyses des ponts disulfure de HSulf-2  | 95  |
| 9      | Chapitre 4 : Influence des modifications post-traductionnelles sur l'activité sulfatase de HSulf-2           | 104 |
| 9.1    | Mesure d'activité arylsulfatase sur le substrat synthétique 4-MUS  | 105 |
| 9.1.1  | Méthodes de la littérature   | 105 |
| 9.1.2  | Mesure en continu de l'activité  | 107 |
| 9.2    | Suivi en continu de l'activité d'HSulf-2 sur le 4-MUS  | 108 |
| 9.3    | Influence de la chaîne de GAG sur l'activité de HSulf-2  | 110 |
| 9.4    | Essai par compétition entre 4-MUS et héparine  | 113 |
| 10     | Chapitre 5 : Discussion et perspectives  | 117 |
| 10.1   | Discussion et perspectives   | 118 |
| 10.1.1 | Caractérisation de la chaîne de glycosaminoglycane portée par HSulf-2  | 118 |
| 10.1.2 | Identification des ponts disulfure de HSulf-2  | 120 |
| 10.1.3 | N-glycosylation de HSulf-2   | 124 |
| 10.1.4 | Mesure de l'activité sulfatase et arylsulfase en mesure continue   | 127 |
| 10.1.5 | Détermination de la structure tridimensionnelle  | 128 |
| 10.1.6 | Vers des inhibiteurs spécifiques des endosulfatases  | 129 |

|         |   |     |
|---------|---|-----|
| 11      | Chapitre 6 : Matériels et méthodes.....   | 131 |
| 11.1    | Matériels .....   | 132 |
| 11.1.1  | Solvants et tampons .....   | 132 |
| 11.1.2  | Réactifs .....  | 132 |
| 11.1.3  | Oligosaccharides et polysaccharides .....   | 133 |
| 11.1.4  | Anticorps.....  | 134 |
| 11.1.5  | Enzymes.....  | 134 |
| 11.1.6  | HSulf-2 et Domaine HD .....   | 135 |
| 11.1.7  | Instruments.....  | 136 |
| 11.2    | Méthodes.....   | 136 |
| 11.2.1  | Électrophorèse des protéines sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)..... | 136 |
| 11.2.2  | Électrophorèse des glucides sur gel de polyacrylamide (C-PAGE) .....                              | 138 |
| 11.2.3  | Western Blot .....  | 139 |
| 11.2.4  | Chromatographie d'exclusion stérique (SEC) .....  | 140 |
| 11.2.5  | Déglycosylation enzymatique de HSulf-2 .....  | 141 |
| 11.2.6  | Digestion protéolytique de HSulf-2.....   | 143 |
| 11.2.7  | Préparation des peptides protéolytiques pour l'analyse nanoLC-MS/MS                               | 146 |
| 11.2.8  | Analyse des peptides par NanoLC-ESI-MS/MS .....   | 146 |
| 11.2.9  | Traitement bio-informatique.....  | 148 |
| 11.2.10 | Analyse MALDI-TOF .....   | 148 |
| 11.2.11 | Test d'activité .....   | 149 |
| 11.2.12 | Analyse RMN .....   | 149 |
| 12      | Références .....  | 150 |
| 13      | Annexes .....   | 168 |
| 14      | Publications .....  | 186 |

## Liste des abréviations

### A

Ac: acétylation  
Asn: asparagine  
Aa: acides aminés

### B

BCAM : bicarbonate d'ammonium  
BMP : bone morphogenetic protein  
BSA: bovine serum albumin

### C

C4ST: chondroïtine 4-O-sulfotransférase  
C6ST: chondroïtine 6-O-sulfotransférase  
CS/DS2ST: 2-O-sulfotransférase  
CID: collision induced dissociation  
C-PAGE: Carbohydrate-PolyAcrylamide  
Gel Electrophoresis  
CS: chondroïtine sulfate  
CSase : chondroïtinase  
CSPG: protéoglycane-chondroïtine sulfate  
CHC: carcinome hépatocellulaire

### D

Da : Dalton  
DDA : Data Dependent Acquisition  
DIA : Data Independent Acquisition  
DTT : DiThioThreitol  
DP : degré de polymérisation  
DS : dermatane sulfate  
DQF-COSY : double quantum filtered  
correlation spectroscopy

### E

EGF : fibroblast growth factor  
ESI: electrospray ionization  
ESI-MS: electrospray ionization followed  
by mass spectrometry

### F

FGly: C $\alpha$ -formylglycine  
FGF: fibroblast growth factor  
FGFR: Fibroblast growth factor receptors  
FTMS: spectrométrie de masse à  
transformée de Fourier  
Fuc: Fucose

### G

GAG(s): glycosaminoglycane(s)  
Gal: D-galactose  
GalN: D-galactosamine  
GalT: galactosyltransférase  
GalNAc: N-acétyl-D-galactosamine  
GalNAcT-I:  $\beta$ -N-  
acétylgalactosaminyltransférase I  
GDNF: Glial Cell Derived Neurotrophic  
Factor  
Glc: D-glucose  
GlcA: acide D-glucuronique  
GlcN: D-glucosamine  
GNS: N-acetylglucosamine-6-sulfatase  
G6S: N-acetylglucosamine-6-sulfatase  
GlcNAc : N-acétyl-D-Glucosamine

### H

HA: hyaluronic acid  
HexN: hexosamine  
HILIC: chromatographie d'interaction  
hydrophile  
HP : héparine  
HPLC: chromatographie liquide haute  
performance  
HS: héparane sulfate  
HSPG: protéoglycane d'héparane sulfate  
HSQC : heteronuclear single quantum  
HEK : human embryonic kidney

### I

IAA: Iodo-Acétamide  
IdoA: acide-L-iduronique  
ITMS : Ion Trap Mass Spectrometry  
ITC : Isothermal titration calorimetry

### K

KD : constante de dissociation à l'équilibre  
KS : kératane sulfate

### L

LC-MS : chromatographie liquide couplée  
à la spectrométrie de masse

## M

MALDI: matrix assisted laser desorption ionization  
Man: mannose  
MPS: mucopolysaccharidose  
MPTs: modifications post-traductionnelles  
MS: spectrométrie de masse  
MS2: spectrométrie de masse en tandem ou multi-étapes  
m/z: rapport masse sur charge  
4-MUS: 4-méthylumbelliféryle sulfate

## N

NA: N-acétylé  
NDST: N-Désacétylase/N-Sulfotransférase  
NS: N-sulfaté

## O

6-OST: 6-O-sulfotransférase

## P

PBS: tampon phosphate salin  
PG: Protéoglycane  
PM: poids moléculaire  
pI: point isoélectrique  
PVA : polyvinyle d'alcool

## Q

QSulf1: Quail Sulf1

## R

RMN: Résonance Magnétique Nucléaire

## S

S: sulfatation  
Ser: sérine  
SDS: sodium dodécyl sulfate  
SG: sérine glycine motif sur lequel une chaîne de GAG peut se greffer  
SEC: chromatographie d'exclusion stérique  
SLC : secondary lymphoid-tissue chemokine

## T

TA: température ambiante  
TFA: acide trifluoroacétique  
TOF: temps de vol

TEMED: N,N,N,N-Tetraméthyléthylènediamine  
TRIS : Tris(hydroxyméthyl)aminométhane  
TOCSY : total correlation spectroscopy  
TEV : protease du virus de la gravure du tabac

## U

UA: uronic acid

## V

4-VP: 4-vinylpyridine  
VEGF : vascular endothelial growth factor

## W

WB : Western Blot

## X

Xyl: xylose

## Liste des figures

|   |    |
|---|----|
| Figure 1 : Exemple d'hydrolyse des esters de sulfate catalysée par les sulfatases.....  | 14 |
| Figure 2 : Mécanisme de formation de la FormylGlycine à partir d'une cystéine. <sup>9</sup> ...   | 15 |
| Figure 3 : Mécanismes catalytiques des hydro-FGly-sulfatases. <sup>2,11</sup> .....   | 16 |
| Figure 4 : Principaux motifs répétitifs disaccharidiques de différents types de GAG (R = H ou SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> et R1 = H, ou SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ou COCH <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) <sup>17</sup> ..... | 18 |
| Figure 5: Homologie de séquence et de structure des domaines pour les Sulfatases lysosomales et les Sulfs de plusieurs espèces. <sup>91</sup> .....   | 32 |
| Figure 6 : Structure schématique de HSulf-2. (D'après I. Seffouh) <sup>94</sup> .....   | 34 |
| Figure 7 : alignement de séquence de l'arylsulfatase K et HSulf-2 selon UniProtKB .   | 37 |
| Figure 8: Modèle de la fixation de HSulf-1 au substrat héparane sulfate <sup>106</sup> .....  | 40 |
| Figure 9 : Schéma de HSulf-2 SNAP-TAG .....   | 45 |
| Figure 10: Mise en évidence du GAG lié à HSulf-2 par SDS-PAGE et digestion enzymatique .....  | 49 |
| Figure 11 : Schéma de la chaîne de CS reliée à HSulf-2 par un linker et de sa digestion par la chondroïtinase ABC .....   | 51 |
| Figure 12 : Identification par Nano-LC-ESI-MS/MS du tétrasaccharide linker de HSulf-2.....  | 53 |
| Figure 13 : Analyse par Western Blot de HSulf-2 révélé par un anticorps anti-chondroïtine sulfate.....  | 57 |
| Figure 14 : Profil C-PAGE de polysaccharides CS-A, CS-B et CS-C et de leur digestion par la HYAL-4. ....  | 61 |
| Figure 15 : Séparation de polysaccharides de CS-A, CS-C et CS-B (DS) digéré par HYAL-4, obtenue par SEC. ....   | 62 |
| Figure 16 : Spectres ESI-MS LTQ Orbitrap en mode négatif des fractions de digestion par HYAL-4 de CS-C (A) et CS-A (B) obtenues à partir de la séparation par chromatographie d'exclusion stérique (SEC).....                 | 63 |
| Figure 17 : Spectres de masse LTQ-Orbitrap des digestions CS-A (A) et CS-C (B) en mode ion négatif ESI-MS.....  | 65 |
| Figure 18 : Intensités des différents oligosaccharides observés par l'ESI-Orbitrap .....  | 66 |

|   |     |
|---|-----|
| Figure 19 : Spectre $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HSQC de standards commerciaux (A) de disaccharides insaturés CS-4S (CS-A) et CS-6S (CS-C) et de tétrasaccharides insaturés dp4 CS A et C et dp4 CS-B ..... | 70  |
| Figure 20 : Spectre $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HSQC à 303K des acides iduronique et glucuronique de standards de tétrasaccharides CS-A/C (4 et 6 S) et CS-B .....   | 71  |
| Figure 21 : Spectre RMN $^1\text{H}$ de la diminution de la présence de glycérol après 5 et 10 cycles de lavage par centrifugation tangentielle.....  | 72  |
| Figure 22 Analyse RMN des protons des résidus formés par la digestion du GAG de HSulf-2 par la HYAL-4.....  | 75  |
| Figure 23 : Types de <i>N</i> -glycanes <sup>126</sup> .....  | 79  |
| Figure 24: Prédiction des <i>N</i> -glycosylations de HSulf-2 par NetNGlyc 1.0. ....  | 80  |
| Figure 25: Couvertures de séquence protéique de HSulf-2 entière. <sup>94</sup> .....  | 81  |
| Figure 26 : Stratégie d'identification des glycopeptides (D'après Y. Mechref) <sup>129</sup> .....  | 82  |
| Figure 27 : Spectre CID de la fragmentation du peptide YHNHNTYTNEN*CSSPSWQAQHESR contenant l'asparagine N88 devenu un résidu d'acide aspartique D88 après désamidation. ....                                  | 85  |
| Figure 28 : Spectres nanoLC-ESI-MS-MS de l'ion précurseur à <i>m/z</i> 962,39, glycopeptide .....   | 90  |
| Figure 29: Spectres nanoLC-ESI-MS-MS de l'ion précurseur à <i>m/z</i> 850,22, glycopeptide .....  | 93  |
| Figure 30 : Spectres MALDI-TOF de HSulf-2 dégagoylée en conditions (A) réductrices .....  | 96  |
| Figure 31 : Spectre ETD de HSulf-2 en conditions non réductrices montrant les peptides .....  | 97  |
| Figure 32: Représentation des ponts disulfure identifiés sur la séquence protéique de HSulf-2.....  | 100 |
| Figure 33: Schéma représentant la répartition des modifications post-traductionnelles .....   | 102 |
| Figure 34: Hypothèse de repliement 3D de HSulf-2 .....  | 103 |
| Figure 35 : Structure du 4-Méthylumbelliféryle sulfate (4-MUS) et de son produit d'hydrolyse (4-MU). ....   | 106 |
| Figure 36 : Cinétique de désulfatation du 4-MUS par HSulf-2 WT, suivi par fluorescence à 465 nm.....  | 109 |

|   |     |
|---|-----|
| Figure 37 : Cinétique de désulfatation du 4-MUS par HSulf-2 et HSulf-2 déglycosylé .....  | 110 |
| Figure 38 : Cinétique de désulfatation du 4-MUS par HSulf-2 WT et SG .....  | 112 |
| Figure 39 : Cinétique de désulfatation du 4-MUS en présence d'héparine par HSulf-2 $\Delta$ GAG.....  | 114 |
| Figure 40 : Cinétique de compétition de la désulfatation du 4-MUS et de l'héparine 1 $\mu$ M/1 nM par HSulf-2 .....   | 115 |
| Figure 41: Fragmentation ETD des ponts disulfure .....  | 121 |
| Figure 42: Hypothèse de repliement 3D de HSulf-2 .....  | 123 |
| Figure 43 : Schéma représentant la répartition des modifications post-traductionnelles identifiées sur HSulf-2, ponts disulfure, <i>N</i> -glycanes et GAG .....  | 125 |
| Figure 44 : Prédiction des sites de coupures théoriques à la furine sur la séquence de HSulf-2 par ProP 1.0 .....   | 126 |
| Figure 45 : Fragment d'héparane sulfate fonctionnalisé pour l'inhibition de HSulf-2 (D'après P. Quellier) <sup>169</sup> .....  | 130 |
| Figure A.46: Abondance relative des différentes structures de <i>N</i> -glycanes présentes sur la position N88 calculée par le logiciel Byonic.....   | 175 |
| Figure A.47 : Abondance relative des différentes structures de <i>N</i> -glycanes présentes sur la position N125 calculée par le logiciel Byonic.....   | 175 |
| Figure A.48 : Abondance relative des différentes structures de <i>N</i> -glycanes présentes sur la position N174 calculée par le logiciel Byonic.....   | 176 |
| Figure A.49 : Abondance relative des différentes structures de <i>N</i> -glycanes présentes sur la position N217 calculée par le logiciel Byonic.....   | 176 |
| Figure A.50 : Abondance relative des différentes structures de <i>N</i> -glycanes présentes sur la position N537 calculée par le logiciel Byonic.....   | 177 |
| Figure A.51 : Spectres nanoLC-ESI-MS-MS de l'ion précurseur à <i>m/z</i> 1121.03, glycopeptide portant l'asparagine N125. (A) fragmentation CID en mode positif avec énergie de collision normalisée à 35% ; (B) fragmentation ETD en mode positif, avec le fluoranthène, ECN à 40% ..... | 178 |
| Figure A.52 : Spectres nanoLC-ESI-MS-MS de l'ion précurseur à <i>m/z</i> 975.43, glycopeptide portant l'asparagine N174. (A) fragmentation CID en mode positif avec énergie de collision normalisée à 35% ; (B) fragmentation ETD en mode positif, avec le fluoranthène, ECN à 40%.....   | 179 |

Figure A.53 : Spectres nanoLC-ESI-MS-MS de l'ion précurseur à m/z 799.57, glycopeptide portant l'asparagine N537. (A) fragmentation CID en mode positif avec énergie de collision normalisée à 35% ; (B) fragmentation ETD en mode positif, avec le fluoranthène, ECN à 40%..... 180

Figure A.54 : Spectre ETD de HSulf-2 digérée en conditions non réductrices montrant les peptides C\*K et AEYQTAC\*EQLGQK contenant les résidus de cystéines C453 et C431 reliés par un pont disulfure. M= [(M+3H)]<sup>3+</sup> ..... 181

Figure A.55 : Spectre ETD de HSulf-2 digérée en conditions non réductrices montrant les peptides DLC\*QR et WQC\*VEDATGK contenant les résidus de cystéines C422 et C440 reliés par un pont disulfure. M= [(M+4H)]<sup>4+</sup> ..... 181

Figure A.56 : Spectre ETD de HSulf-2 digérée en conditions non réductrices montrant les peptides YVHNHNTYTNNEC\*SSPSWQAQHEsr et QC\*NPR contenant les cystéines C89 et C798 reliés par un pont disulfure. M= [(M+5H)]<sup>5+</sup> ..... 182

Figure A.57 : Spectre ETD de HSulf-2 digérée en conditions non réductrices montrant les peptides YYGQGSEAC\*TC\*DSGDYK et KRPEEC\*DC\*H contenant les résidus de cystéines C480/C482 et C636/C638 reliés par des ponts disulfures. M= [(M+5H)]<sup>5+</sup> ..... 182

Figure A.58 : Spectre ETD de HSulf-2 digérée en conditions non réductrices montrant les peptides AEYQTAC\*EQLGQK et GYKQC\*NPR contenant les résidus de cystéines C431 et C798 reliés par un pont disulfure. M= [(M+5H)]<sup>5+</sup> ..... 182

Figure A.59 : Spectre ETD du domaine HD isolé digéré en conditions non réductrices montrant le peptide YYGQGSEAC\*TC\*DSGDYK contenant les résidus de cystéines C636 et C638 relié par un pont disulfure intrapeptide. M= [(M+3H)]<sup>3+</sup> ..... 183

Figure A.60 : Spectre ETD du domaine HD isolé digéré en conditions non réductrices montrant les peptides DLC\*QR et WQC\*VEDATGK contenant les résidus de cystéines C422 et C440 reliés par un pont disulfure. M= [(M+4H)]<sup>4+</sup> ..... 183

Figure A.61 : Spectre ETD du domaine HD isolé digéré en conditions non réductrices montrant les peptides C\*K et AEYQTAC\*AQLGQK contenant les résidus de cystéines C453 et C431 reliés par un pont disulfure. M= [(M+3H)]<sup>3+</sup> ..... 184

Figure A.62 : Spectre ETD du domaine HD isolé digéré en conditions non réductrices montrant les peptides DLC\*QR et AEYQTAC\*AQLGQK contenant les résidus de cystéines C422 et C431 reliés par un pont disulfure. M= [(M+4H)]<sup>4+</sup> ..... 184

Figure A.63 : Spectre ETD du domaine HD isolé digéré en conditions non réductrices montrant les peptides YYGQGSEAC\*TC\*DSGDYK et KRPEEC\*DC\*HK contenant les



résidus de cystéines C480/C482 et C636/C638 reliés par des ponts disulfures. M= [(M+5H)]<sup>5+</sup>  
..... 185

## Liste des tableaux

|   |     |
|---|-----|
| Tableau 1 : Les Sulfatases humaines identifiées à ce jour, leur localisation et substrats naturels <sup>1,2</sup> .....   | 17  |
| Tableau 2 : Troubles héréditaires résultant d'une carence en une seule sulfatase. <sup>2,90</sup> .   | 30  |
| Tableau 3 : Tableau des masses moléculaires théoriques de HSulf-2 SNAP/TAG .....  | 46  |
| Tableau 4 : Liste des peptides détectés contenant la Sérine S559 modifiée ou non ....   | 55  |
| Tableau 5 : Liste des glycopeptides de HSulf-2 détectés par analyse nanoLC-MS/MS (CID/ETD), l'étoile désigne l'asparagine lié au <i>N</i> -glycane. ....  | 83  |
| Tableau 6 : Liste des peptides désamidés détectés par nano-LC-MS/MS (CID/ETD) après action de la PNGase sur HSulf-2. 3 ag de HSulf-2 est digéré par la PNGaseF puis par la trypsine avant injection de 6 pmoles en nanoLC .....   | 84  |
| Tableau 7 : Pourcentage relatif des peptides glycosylés les plus abondants pour chaque position sur HSulf-2, estimé à l'aide du logiciel Byologic par Protein Metric.....   | 87  |
| Tableau 8 : Tableau récapitulatif des peptides de HSulf-2 liés par des ponts disulfure. (A) HSulf-2 entière, (B) domaine HD isolé. ....   | 98  |
| Tableau 9 : Modifications principales des résidus cystéine et incréments de masse en résultant .....  | 101 |
| Tableau A.10 : Numérotation des résidus de HSulf-2 cités dans ce manuscrit selon la numérotation UniprotKB (comprenant le peptide signal) et la numérotation sans peptide signal utilisée dans ce manuscrit. Le peptide signal est composé de 24 acides aminés (aa). .... | 169 |

## Introduction générale et objectif de la thèse

Les sulfatases sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse du groupe sulfate des fonctions ester de sulfates (CO-S) ou sulfamates (CN-S). Il en existe différentes sous-familles définies en fonction de leur spécificité de substrat, du site catalytique ou de localisation subcellulaire. Une sous-famille appelée famille S1 regroupe la majorité des sulfatases, notamment toutes les sulfatases humaines et se caractérise par une grande conservation de séquence. Cependant, ces sulfatases ont des rôles ainsi que des conséquences physiologiques et pathologiques très variées. Parmi cette famille, la 6-O-endosulfatase **HSulf-2** a été découverte en 2002. Depuis 20 ans, de nombreuses études ont permis de déterminer le rôle central de cette enzyme dans le développement embryonnaire mais également son implication dans diverses pathologies comme les cancers. HSulf-2 est donc devenue un biomarqueur de progression tumorale. Malgré ses similarités de séquence avec les autres sulfatases de la famille S1, il est nécessaire de connaître finement sa structure et de la relier à son activité, dans le but d'identifier des inhibiteurs spécifiques de cette sulfatase. La séquence en acide aminés de HSulf-2 étant connue, la relation structure/activité sera déterminée à partir de caractéristiques structurales spécifiques, à savoir les modifications post-traductionnelles (MPTs). Ce travail a été amorcé en 2015 avec la thèse d'Ilham Seffouh portant sur l'analyse protéomique de HSulf-2, et la détermination de l'incrément de masse attribué aux MPTs.

Dans la continuité de ce projet, l'objectif de cette thèse est la poursuite de la caractérisation protéomique mais aussi structurale de HSulf-2 qui participera à la compréhension de son mécanisme d'action.

Le **chapitre 1** expose l'évolution des connaissances sur HSulf-2 depuis sa découverte en 2002 jusqu'à ce jour. Cette présentation non exhaustive regroupe les connaissances établies

dans les domaines physiopathologiques, structuraux et fonctionnels afin de mieux appréhender les enjeux de cette thèse.

Dans le **chapitre 2**, nous nous sommes intéressés à une modification singulière de HSulf-2 qui est une *O*-glycosylation. A l'aide de stratégies variées telles que l'immunodétection, la spectrométrie de masse et la RMN, nous avons caractérisé ce glycosaminoglycane de sa position à sa structure.

Le **chapitre 3** est axé sur la caractérisation des modifications post-traductionnelles plus usuelles des protéines telle que la *N*-glycosylation. Nous nous sommes également intéressés à la structure tridimensionnelle de cette protéine, à savoir son repliement, notamment par l'identification des ponts disulfures. A ces fins, nous avons employé différentes techniques analytiques et biochimiques telles que l'électrophorèse ou la spectrométrie de masse alliant plusieurs méthodes de fragmentations.

Dans le **chapitre 4**, nous avons tenté de déterminer l'influence de ces modifications post-traductionnelles sur l'activité enzymatique, notamment celle du glycosaminoglycane que nous avons caractérisé. Pour ce faire, nous avons mis au point une méthode de suivi continu sur un substrat synthétique fluorescent.

Pour conclure ce manuscrit, le **chapitre 5** discute des données structurales et protéomiques obtenues au cours de ces travaux afin de les remettre en perspective avec la littérature et d'identifier les nouvelles questions que posent ces avancées dans la caractérisation de cette enzyme complexe qu'est HSulf-2.

# **Chapitre 1 : Introduction**

A la différence de la numérotation de référence définie par la base de données UniProtKB, nous avons pris le parti de ne pas tenir compte du peptide signal de 24 résidus dans la numérotation des acides aminés de HSulf-2. Ce peptide est absent de la protéine produite par l'équipe SAGAG et étudiée durant cette thèse. Cependant, afin de permettre une correspondance avec la littérature, les résidus cités dans ce manuscrit sont regroupés dans un tableau en annexe A.10 reprenant l'équivalent en numérotation avec et sans peptide signal.

## HSulfs, 20 ans d'histoire de ces enzymes uniques

### 5.1 Les sulfatases

De manière succincte, les sulfatases (EC 3.1.6-) forment une famille d'enzymes catalysant l'hydrolyse des liaisons ester sulfate à partir d'un large éventail de substrats sulfatés tels que les stéroïdes, les glycolipides et les protéoglycanes.<sup>1</sup> Elles catalysent la désulfonation des esters de sulfates et des sulfamates.

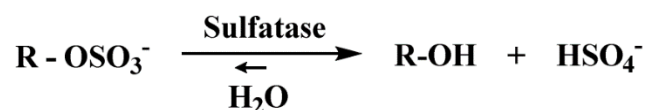


Figure 1 : Exemple d'hydrolyse des esters de sulfate catalysée par les sulfatases.

Elles sont impliquées dans de nombreux processus physiologiques comme la régulation hormonale, la dégradation cellulaire et le contrôle des voies de signalisation. Les sulfatases montrent des homologies de séquences élevées (20-60%).<sup>2</sup> Leurs structures et leurs activités sont conservées chez les procaryotes et eucaryotes. A ce jour chez l'Homme, 17 sulfatases ont été identifiées, parmi lesquelles HSulf-1 et HSulf-2 sont les plus récemment découvertes (Tableau 1).<sup>1-4</sup> Une classification des sulfatases basée sur leurs spécificités de substrat a été publiée par Barbeyron *et al*<sup>5</sup> en 2016, nous permettant de classer les HSulfs comme des

membres de la famille des hydro-FGly-Sulfatases. Toutes les sulfatases de cette famille possèdent un résidu catalytique de type FormylGlycine. <sup>5-8</sup> Le mécanisme de formation de la FormylGlycine à partir d'une cystéine est détaillé figure 2. <sup>9</sup>

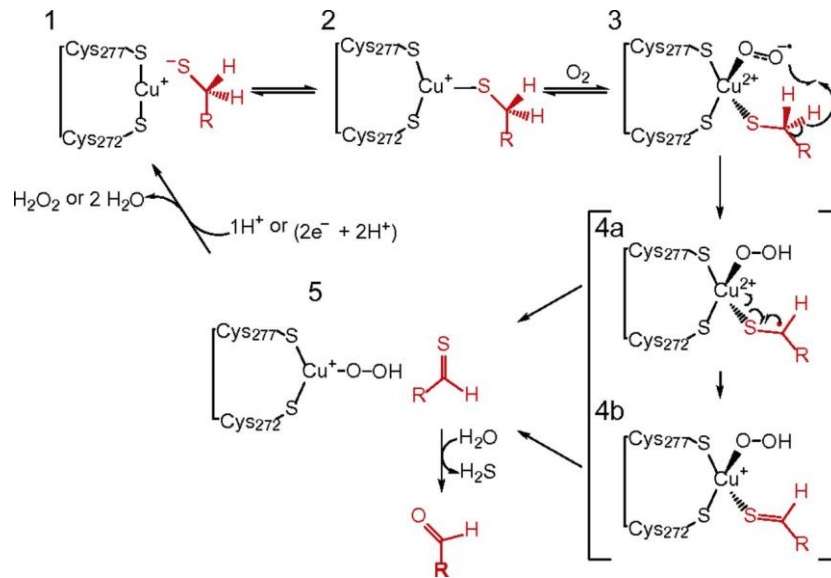
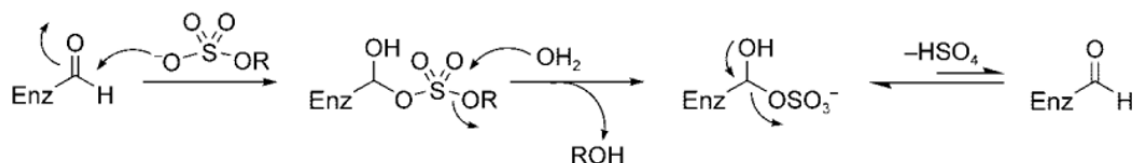


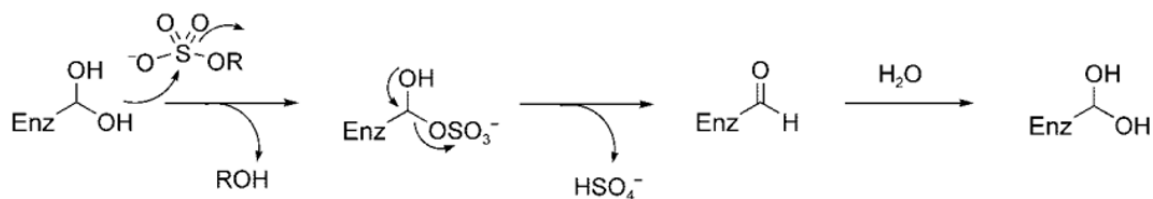
Figure 2 : Mécanisme de formation de la FormylGlycine à partir d'une cystéine. <sup>9</sup>

Le mécanisme catalytique des hydro-FGly-Sulfatases est resté longtemps inconnu et les connaissances dans ce domaine firent un bond en 1997 avec la première élucidation de la structure d'une sulfatase humaine lysosomale nommée HARSB par cristallographie. <sup>10</sup> En partant des observations faites sur cette sulfatase et sur une seconde appelée HARSa, deux mécanismes d'action ont été proposés par Hanson *et al* en 2004. Un premier par addition et hydrolyse du groupement sulfate et un second par transestérification puis élimination du sulfate (Fig 3). <sup>2,11</sup>

a) Mécanisme: Addition-Hydrolyse



b) Mécanisme: Transestérification-Elimination



**Figure 3 : Mécanismes catalytiques des hydro-FGly-sulfatases.** <sup>2,11</sup>

Schémas mécanistiques proposés pour l'hydrolyse des esters sulfates par le site actif aldéhyde FGly. a) Un mécanisme d'addition-hydrolyse (AH) a été proposé sur la base de l'interprétation d'un hémiacétal sulfate (FGS) dans la structure cristalline du HARSB comme état de repos du cycle catalytique. b) Un mécanisme de transestérification-élimination (TE) a été proposé pour le groupe aldéhyde hydraté (FGH) présent dans la structure cristalline de HARSA.

Ces mécanismes sont toujours retenus à ce jour et en l'absence de données de cristallisation des HSulfs, on suppose qu'elles suivent l'un des mécanismes décrits pour cette famille des hydro-FGly-sulfatases.

**Tableau 1 : Les Sulfatases humaines identifiées à ce jour, leur localisation et substrats naturels <sup>1,2</sup>**

Liste des abréviations pages 1 et 2

\*SULF1 et SULF2 sont les seules sulfatases à avoir une activité endolytique.

| Localisation cellulaire<br>pH d'activité |                            | Nom de la sulfatase               | bbr.                       | Substrats<br>physiologiques                            |
|--|----------------------------|-----------------------------------|----------------------------|--|
| Lysosomale<br>pH acide 3,8-5,7           |                            | Arylsulfatase A                   | ARSA                       | Cérébroside-3S<br>Seminolipide-3S<br>Psychosine-3S     |
|  |                            | Arylsulfatase B                   | ARSB                       | GalN <sub>4S</sub> (CS)                                |
|  |                            | N-acétylgalactosamine-6-sulfatase | GALNS                      | GalNAc <sub>6S</sub> (CS)<br>Gal <sub>6S</sub> (KS)    |
|  |                            | N-acétylglucosamine-6-sulfatase   | GNS/G6S                    | GlcNAc <sub>6S</sub> (HS)<br>GlcNAc <sub>6S</sub> (KS) |
|  |                            | N-sulfoglucosamine sulfohydrolase | GSH                        | GlcNS (HS)   |
|  |                            | Iduronate-2-sulfatase             | IDS                        | IdoA <sub>2S</sub> (HS)                                |
| Non-Lysosomale<br>pH neutre 7            | microsomale                | Arylsulfatase C                   | ARSC/STS                   | Estrone-S<br>Pregnonolone-S<br>Cholesterol-S<br>DHEA-S |
|  | Réticulum<br>endoplasmique | Arylsulfatase D                   | ARSD                       | Inconnu  |
|  |                            | Arylsulfatase F                   | ARSF                       | Inconnu  |
|  |                            | Arylsulfatase G                   | ARSG                       | GlcN <sub>3S</sub> (HS)                                |
|  |                            | Arylsulfatase I                   | ARSI                       | Inconnu  |
|  |                            | Arylsulfatase J                   | ARSJ                       | Inconnu  |
|  | Golgi                      | Arylsulfatase E                   | ARSE                       | Inconnu  |
|  | Non déterminé              | Arylsulfatase H                   | ARSH                       | Inconnu  |
| Arylsulfatase K                          |                            | ARSK                              | IdoA <sub>2S</sub> (HS/CS) |  |
| Extracellulaire<br>pH neutre-basique 7,5 |                            | Sulfatase 1                       | SULF1                      | GlcN <sub>6S</sub> (endo* HS)                          |
|  |                            | Sulfatase 2                       | SULF2                      | GlcN <sub>6S</sub> (endo* HS)                          |

## 5.2 La découverte d'une nouvelle sulfatase

L'étude des HSulfs commence en 2001<sup>12</sup> avec l'identification du gène de QSulf1. Il s'agit d'une sulfatase aviaire identifiée dans l'embryon de caille. Elle est décrite à l'époque comme un orthologue aviaire de la famille des *N*-acétyl glucosamine sulfatases humaines, spécifique des polysaccharides d'héparanes sulfate (HS) présents à la surface des cellules. Les orthologues sont des gènes similaires présents chez différentes espèces.



La *N*-acetylglucosamine-6-sulfatase appelée GNS ou G6S est une exosulfatase impliquée dans la dégradation des unités saccharidiques d'héparane sulfate dans le lysosome.

13,14

L'héparane sulfate (HS) représente une famille de glycosaminoglycanes (GAG). Ce sont des hétéropolysaccharides linéaires,<sup>15,16</sup> dont le squelette osidique est constitué de la répétition d'unités disaccharidiques acide uronique (UA) - hexosamine. Les GAGs (Fig 4)<sup>17,18</sup> se distinguent par des unités UA qui peuvent être soit un acide  $\beta$ -D- glucuronique (GlcA) soit sa version épimérisée en C5, l'acide  $\alpha$ -L -iduronique (IdoA).<sup>19</sup> L'hexosamine peut être soit dérivé de glucose (Glc) ( $\alpha$ -D - ou  $\beta$ -D- glucosamine, GlcN), soit dérivé de galactose (Gal), sous forme de *N*-acétyl- $\beta$ -D- galactosamine (GalNAc). Ce disaccharide peut être jusqu'à tri-sulfaté pour HS ou non sulfaté pour l'acide hyaluronique. Chez les eucaryotes, seul HS a la propriété de pouvoir subir une désulfatation post-synthétique à la surface cellulaire, modulant ainsi ses charges et propriétés d'interaction.<sup>19</sup>

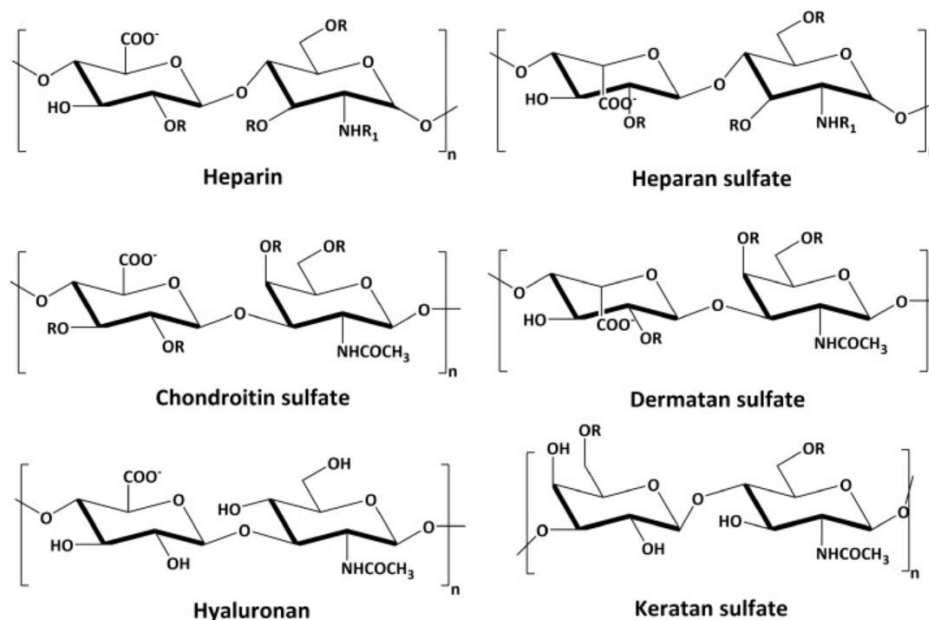


Figure 4 : Principaux motifs répétitifs disaccharidiques de différents types de GAG (R = H ou SO<sub>3</sub><sup>-</sup> et R1 = H, ou SO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou COCH<sub>3</sub><sup>-</sup>)<sup>17</sup>

Il a été montré que QSulf1 est exprimée pendant l'embryogenèse et est nécessaire à la différenciation des cellules musculaires.<sup>12,20</sup> Cette enzyme est localisée à la surface des cellules et régule une voie de signalisation appelée « Wnt signaling » qui est dépendante de HS. Wnt est une famille de messagers protéiques, ligands de récepteurs membranaires. Ces protéines Wnt sont retenues à la surface cellulaire par interaction avec les chaînes HS, ce qui régule la signalisation cellulaire. On montre donc dès 2001 que certaines voies de signalisation sont régulées *via* la désulfatation des HSPGs (protéoglycane d'héparane sulfate) par des sulfatases à la surface des cellules.

C'est un an plus tard, en 2002, que le groupe du Dr Steven D.Rosen<sup>21</sup> identifiera véritablement deux orthologues, humain et souris de QSulf1. Chez l'Homme, deux ADNc sont identifiés et les protéines correspondantes appelées HSulf-1 et HSulf-2.

Cet article de Rosen *et al.* démontre une singularité des HSulfs parmi les 17 sulfatases humaines connues à ce jour (Tableau 1). Tout comme les sulfatases non lysosomales, les deux sulfatases présentent une activité arylsulfatase sur substrat synthétique avec un pH optimal neutre. Cependant, elles sont les seules sulfatases connues à être sécrétées dans le milieu extracellulaire. Dans ce milieu, elles peuvent désulfater la position C-6 d'une glucosamine dans des régions spécifiques de HS. Pris ensemble, ces résultats établissent que les HSulfs sont des sulfatases extracellulaires à fort potentiel pour moduler les interactions des protéoglycanes héparane sulfate dans le microenvironnement extracellulaire. En reliant cette information au précédent article sur QSulf1, nous pouvons poser l'hypothèse que ces HSulfs seront des protéines d'intérêt pour l'étude des voies de signalisation chez l'Homme par le biais des HS.

Depuis ces découvertes, des articles ont rapporté la caractérisation des sulfatases aussi bien pour l'orthologue aviaire<sup>20</sup> que pour plusieurs mammifères et autres espèces. A ce jour, en

plus de chez la caille, le rat, la souris et l'Homme, les gènes Sulf-1 et -2 ont été également identifiés chez le poulet<sup>22</sup>, le xénope<sup>23,24</sup>, le poisson zèbre<sup>25</sup>, l'oursin<sup>26</sup> et la drosophile<sup>27</sup>.

Ces enzymes semblent donc être conservées chez plusieurs espèces, cette observation renforce l'intérêt pour ces enzymes qui doivent avoir un rôle important qui justifierait cette conservation inter-espèces.

La première donnée à être précisée fut le substrat, les HSulfs sont des héparanes sulfatases (HS) 6-*O*-endosulfatase, avec une préférence pour le motif trisulfaté IdoA2S-GlcNS6S (acide-L-iduronique, D-glucosamine).<sup>20</sup>

Ce disaccharide tri-sulfaté ne représente qu'un faible pourcentage de la composition des chaînes d'héparane sulfate sur les HSPG cellulaires. En effet en fonction des études, le traitement de chaînes de HS avec HSulf-1 ou HSulf-2 conduit à une désulfatation de 50-70% des disaccharides 6-*O* sulfatés, correspondant en moyenne à une diminution de 15% de 6-*O*-sulfatation. Ramenée à la totalité du polysaccharide, l'action des Sulfs ne produit donc qu'une réduction de la désulfatation de 4-5%.<sup>19</sup> On peut donc se demander si la désulfatation de quelques HS a une réelle influence physiologique ? Et en quoi cela est-il assez important pour que ces enzymes soient conservées chez les mammifères comme chez les oiseaux ?

Pour répondre à ces interrogations nous pouvons distinguer les recherches sur les HSulfs en trois catégories. Les découvertes structurales, celles portant sur l'activité enzymatique et celles portant sur les rôles biologiques.

## 5.3 Les HSulfs, enzymes aux rôles biologiques complexes

### 5.3.1 Les Sulfs, protéines du développement

L'élimination du 6-*O*-sulfate de HS *via* l'activité Sulf régule l'interaction de ce GAG avec de multiples ligands,<sup>28</sup> en 2021 l'interactome de HS a été estimé à plus de 500 molécules.<sup>29-31</sup> On peut citer par exemple les facteurs de croissance (FC) VEGF, FGF- 1, SDF-1/CXCL12 et SLC.<sup>16,32</sup> Cette élimination régiosélective module la signalisation d'autres FC : Wnt<sup>12,20</sup>, GDNF<sup>33,34</sup>, FGF-2, FGF-4, HGF<sup>35,36,37</sup>, HB/EGF, BMP<sup>38,39</sup>, TGFβ<sup>22</sup>, et l'amphireguline.<sup>40</sup>

En 2004, une étude a montré l'influence de cette régulation sur l'embryogenèse. En effet, les chaînes HS sont capables de réguler l'activité des morphogènes par interaction avec ces derniers. La morphogénèse est l'ensemble des transformations que subit l'embryon avant d'acquérir sa forme spécifique. Elle implique des facteurs, ou morphogènes, qui dictent le devenir des cellules en formant des gradients de concentration aux seins des tissus. Les morphogènes exercent leurs effets sur de longues distances, généralement en se propageant d'une cellule à l'autre pour activer la transduction du signal dans les tissus environnants de manière dépendante de la concentration. Parmi ces morphogènes on peut citer les protéines des familles Wnt, TGF-β /BMP et Hedgehog.<sup>2,41</sup>

Les Sulfs, modulateurs de la sulfatation des HS, sont également impliquées dans le développement du squelette. Plusieurs troubles squelettiques chez l'Homme et des mutants de souris ont été associés à des modifications structurales des chondroïtines sulfate (CS) et/ou héparanes sulfate (HS) portés par des protéoglycanes, telles que l'aggrécane, le glypicane 3 et le perlécane.<sup>42-44</sup>

Les deux gènes Sulfs sont exprimés dans une grande variété de tissus tout au long du développement. Depuis 2007, on sait que chez la souris les transcrits Sulf-2 sont exprimés dans les poumons, le cœur, le placenta et les côtes.<sup>28</sup> Les souris Sulf-2<sup>-/-</sup> présentent des anomalies neuro-anatomiques et les souris Sulf-1<sup>-/-</sup> des défauts de plasticité synaptique associés à une courte colonne vertébrale.<sup>45</sup> De plus chez la souris, les mutants Sulf-1<sup>-/-</sup> et Sulf-2<sup>-/-</sup> ont un haut taux de mortalité (54%) durant les 6 premières semaines après la naissance.<sup>46</sup> Au cours de l'embryogenèse, les Sulfs favorisent également l'innervation de l'œsophage en améliorant la croissance et la migration neuronale dépendante de la signalisation du GDNF.<sup>47</sup>

Les molécules de signalisation Hedgehog (Hhs) sont un autre exemple de morphogène interagissant avec les HS. Elles contrôlent la croissance et la structuration au cours du développement et sont également impliquées dans la progression de nombreux cancers. Des mécanismes qui libèrent, transportent et reçoivent des Hhs sont nécessaires pour susciter des réponses spatio-temporelles spécifiques dans les cellules et les tissus. Les Hhs se lient fortement aux protéoglycanes extracellulaires à héparane sulfate (HSPG), ce qui devrait réduire leur propagation. Paradoxalement, plusieurs éléments suggèrent que la formation du gradient Hh nécessite l'expression de HSPG et que les HSPG agissent à la fois comme des régulateurs positifs et négatifs de la fonction Hh.<sup>48</sup> Les chaînes d'HS permettraient donc leur multimérisation, leur accumulation et leur stabilisation à la surface cellulaire, puis leur diffusion.<sup>49,50</sup>

Depuis 2015, les recherches se sont axées sur les rôles pathologiques des Sulfs. Indispensable au développement, la désulfatation des protéoglycanes semble également être un point critique dans l'oncogenèse.<sup>51</sup>

### 5.3.2 HSulf-1, un rôle suppresseur de tumeur nuancé

C'est en 2003 que le premier lien entre les HSulfs et le cancer fut démontré. Un groupe du Minnesota remarqua que HSulf-1 est présente dans de nombreux tissus sains mais indétectable ou diminuée de 75% dans des tissus cancéreux.<sup>52</sup> L'observation fut faite sur des cellules du cancer des ovaires, du sein, du pancréas et des reins. Ils ont également remarqué que la ré-expression de HSulf-1 dans ces cellules conduit à une réduction de la prolifération cellulaire et une augmentation de la sensibilité aux signaux d'apoptose.<sup>52</sup>

Ils démontrèrent que la régulation négative de HSulf-1 représente un nouveau mécanisme par lequel les cellules cancéreuses accroissent la signalisation des facteurs de croissance.<sup>52</sup> HSulf-1 pourrait être une nouvelle voie de lutte contre le cancer en agissant comme un suppresseur tumoral.<sup>35</sup>

Dès lors, plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer l'implication de HSulf-1 dans cette lutte. On peut citer par exemple en 2014, dans les cellules cancéreuses où HSulf-1 est re-exprimée, l'étude sur la diminution de la surexpression des HGF (hepatocyte growth factor)<sup>53</sup> qui sont responsables de la mobilité et de l'invasion cellulaire. La surexpression de HSulf-1 dans les cellules cancéreuses du sein inhibe à la fois la croissance tumorale et l'angiogenèse et augmente l'apoptose des cellules cancéreuses *in vivo*. Ces effets reposent sur la régulation négative de l'activité des facteurs pro-angiogéniques liant l'héparine, y compris le facteur de croissance VEGF<sub>165</sub>.<sup>54</sup> VEGF-D est un ligand des récepteurs du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGFRs) qui peut activer les voies de l'angiogenèse, de la croissance et de la migration des cellules endothéliales. De la même façon, QSulf1 a été décrite en 2004 comme un inhibiteur du FGF (fibroblast growth factor) responsable de l'angiogenèse chez l'embryon aviaire et potentiellement dans les tissus cancéreux.<sup>36</sup> Ces phénomènes étant

étudiés *in vivo* ou à l'échelle de la cellule, les mécanismes moléculaires mis en jeu ne sont à ce jour pas élucidés.

De plus, la surexpression de HSulf-1 dans les cellules cancéreuses hépatocellulaires a montré un impact négatif sur la prolifération et la migration et un effet positif sur l'apoptose dans le carcinome hépatocellulaire. Ces effets reposent sur la régulation négative de la voie de signalisation stat3 (signal transducer and activator of transcription 3). La voie Stat3 est connue pour réguler la prolifération, la motilité et l'apoptose cellulaire. Il a été montré que HSulf-1 inhibe la phosphorylation du facteur du même nom, stat3. Le mécanisme de cette inhibition reste à démontrer mais une étude récente en 2020 a montré que l'action de HSulf-1 sur cette voie de signalisation pourrait faire de cette enzyme une alternative de traitement pour le cancer TNBC (triple négative Breast cancer) qui représente 10 à 20% des cancers du sein.<sup>55</sup> L'activité antiproliférative de HSulf-1 dans les cellules HepG2 de carcinome hépatocellulaire est également due à l'arrêt du cycle cellulaire et à l'apoptose.<sup>56</sup>

En 2014, une autre étude a confirmé le rôle suppresseur de tumeur de HSulf-1 dans le cancer de l'ovaire, le défaut de HSulf-1 induisant une tumorigénicité accrue chez les souris nude (immuno-déficiente) *in vivo*, accompagné d'une diminution de l'expression de la protéine pro-apoptotique Bim après la perte de HSulf-1. A l'inverse, la surexpression de HSulf-1 inhibe la croissance tumorale<sup>57</sup>.

Toutes ces données convergent vers un rôle anti-tumorigène de HSulf-1. Toutefois, d'autres études apportent des résultats contradictoires en présentant notamment une surexpression de l'enzyme HSulf-1 dans le cancer de l'ovaire<sup>58</sup>, des voies digestives<sup>59,60</sup>, du pancréas<sup>61-63</sup> et la leucémie.<sup>64</sup> La surexpression de HSulf-1, dans le cancer du pancréas, est associée à un effet pro-tumoral.<sup>62,63</sup> De plus, les cellules cancéreuses pancréatiques sur-exprimant HSulf-1 présentent un caractère invasif avéré *in vitro* et forment des métastases *in*

*vivo*.<sup>62</sup> Une étude en 2015 a montré que la surexpression de Sulf-1 / 2 entraîne une augmentation de la viabilité et de la prolifération, ainsi qu'une augmentation de la migration cellulaire dans les cellules du cancer colorectal.<sup>65</sup>

À l'heure actuelle, malgré ces données contradictoires, on considère que HSulf-1 est une protéine suppresseur de tumeur.

### 5.3.3 HSulf-2, une enzyme pro-oncogène ?

En ce qui concerne HSulf-2, ce fut une nouvelle fois l'équipe de Steven Rosen découvreur des HSulfs, qui en 2005 publia le premier article montrant l'activité pro-angiogénique de HSulf-2. Cet article pointe alors la première différence entre ces deux HSulfs qui semblaient identiques jusqu'alors. HSulf-2 y est décrite comme une enzyme pro-angiogénique et surexprimée dans le cancer du sein,<sup>66</sup> là où HSulf-1 était décrite comme sous-exprimée. Une autre étude en 2008 a ensuite montré que l'expression de HSulf-2 est augmentée dans 73 % des lignées cellulaires de carcinomes hépatocellulaires (HCC). L'expression accrue de HSulf-2 stimule la croissance et la migration des cellules HCC, tandis que son blocage met fin à la prolifération des cellules HCC et à la migration *in vitro*.<sup>33</sup> À l'inverse, il a été montré que HSulf-1 est régulée à la baisse dans les lignées de cellules de carcinome hépatocellulaire (HCC).<sup>67-69</sup>

En 2005, le groupe de Rosen a signalé que le niveau d'expression de Sulf-2 est huit fois plus élevé dans le carcinome du sein que dans les tissus normaux, alors que cette augmentation n'a pas été observée avec Sulf-1 dans le cancer du sein humain et dans des modèles murins. De plus, HSulf-2 peut être détectée dans certaines lésions pré-cancéreuses et dans les tumeurs. L'hypothèse alors formulée est que l'augmentation de l'angiogenèse tumorale est due à la mobilisation de facteurs angiogéniques liés aux HS ou séquestrés dans la matrice extracellulaire



sous l'action de HSulf-2.<sup>66</sup> Cette observation fait de HSulf-2 un potentiel biomarqueur du cancer du sein, donnant une fois encore un rôle important à cette protéine.

Quelques années plus tard, en 2013, toujours d'après l'hypothèse selon laquelle HSulf-2 pourrait potentiellement être un facteur oncogène dans le cancer du sein,<sup>70</sup> il a été montré que l'inhibition de l'expression de HSulf-2 dans les cellules MCF10DCIS induisait la mort cellulaire de ces dernières. Ces cellules expriment HSulf-2 et forment un carcinome canalaire *in situ* qui progresse vers un carcinome canalaire invasif lorsqu'elles sont transplantées chez des souris immunodéficientes. En favorisant leur mort cellulaire par apoptose, HSulf-2 atténue cette progression *in vivo*.<sup>71</sup> Ces auteurs ont montré au cours de la même année que l'inhibiteur du protéasome Bortezomib réduit la taille de la tumeur, accompagné par une apoptose massive et la réduction du niveau d'expression de HSulf-2 *in vivo*. Le Bortezomib, inhibiteur du protéasome, est également efficace pour réprimer l'expression de HSulf-2 dans un certain nombre de lignées cellulaires de cancer humain.<sup>72</sup> En 2016, des études ont été menées pour essayer de comprendre l'influence de la concentration de HSulf-2 sur la progression du carcinome rénal,<sup>73</sup> cependant à ce jour les mécanismes restent inconnus.

La même année, une étude comparative de l'effet de la surexpression et de la diminution de la traduction de HSulf-2 par l'utilisation d'un ARN interférant a montré que l'expression de HSulf-2 favorisait la progression du cancer du sein en stimulant la prolifération des cellules cancéreuses, et en augmentant l'invasion et la mobilité. La surexpression de HSulf-2 est corrélée à une augmentation de la capacité de cicatrisation et d'adhésion cellulaire à la fois *in vitro* et *in vivo*. HSulf-2 inhibe également l'apoptose des cellules cancéreuses, favorise la tumorigénicité des cellules cancéreuses du sein *in vivo* et stimule l'expression des gènes liés à ces tumeurs comme celui du VEGF-D. À l'inverse, l'inhibition de la traduction de HSulf-2 diminue significativement la prolifération cellulaire, l'invasion, la mobilité et l'adhésion, augmente

l'apoptose cellulaire, et réprime l'expression de VEGF-D dans les cellules cancéreuses mammaires.<sup>74,75</sup> Sur la base de ces études et des niveaux d'expression élevés de Sulf-2 dans plusieurs cancers, HSulf-2 est considérée comme un agent cancérigène dans plusieurs types de cancer et joue un rôle important dans la progression tumorale.

Toutefois, comme pour HSulf-1, la littérature rapporte des résultats contradictoires. Une étude avait montré en 2005 que HSulf-1 et HSulf-2 sont des puissants inhibiteurs de la croissance tumorale du myelome *in vivo* par la diminution de la signalisation de FGF-2: les Sulfs peuvent réguler la croissance cellulaire dans un microenvironnement tumoral par un mécanisme faisant intervenir HS comme co-récepteur des facteurs de croissance. Selon ce mécanisme, HSulf-2 inhibe les signalisations déclenchées par ces facteurs en altérant le niveau de 6-O-S des HS.<sup>76</sup> Par ailleurs, le groupe de Paolo Martini<sup>77</sup> a montré en 2010 qu'une expression stable de Sulf-2 dans les cellules du cancer du sein inhibe la signalisation FGF, diminue la prolifération, l'invasion et la métastase des cellules du cancer du sein *in vitro*. Les résultats ont été ensuite confirmés par la diminution de la croissance tumorale *in vivo*. En revanche, l'administration intra-tumorale de HSulf-2 recombinante n'inhibe pas davantage la croissance tumorale *in vivo*, suggérant que l'effet observé par Martini *et al* nécessite un niveau d'expression stable.<sup>77</sup>

L'ensemble de ces données, parfois contradictoires, indique un rôle de HSulf-2 dans la progression du cancer, mais les mécanismes demeurent encore mal compris. L'implication de HSulf-2 varie selon le type de cancer, la lignée cellulaire, le stade et les niveaux d'expression de cette enzyme. Malgré cette complexité, plusieurs travaux proposent l'utilisation de HSulf-2 comme un biomarqueur pour le diagnostic de certains cancers. En effet le taux de HSulf-2 est très élevé dans le sérum des patients atteints de cirrhose comparé aux individus en bonne santé, suggérant son utilisation comme outil de diagnostic (biomarqueur sérologique) pour cette

pathologie.<sup>78</sup> En 2016, il a été montré que les taux sanguins de HSulf-2 peuvent également jouer un rôle dans le diagnostic et pronostic du cancer du poumon.<sup>79</sup>

Les rôles opposés dans le cancer de ces HSulfs, pourtant si similaires, ont donc été mis en exergue.

Pour résumer, HSulf-2 est donc considérée comme une enzyme pro-oncogène à l'inverse de HSulf-1. En effet, HSulf-2 est surexprimée dans les cellules cancéreuses et favorise la tumorigenèse dans le cancer du poumon<sup>80</sup> et le cancer du pancréas<sup>63</sup> les carcinomes hépatocellulaires<sup>81</sup>, cancer colorectal<sup>82</sup> et le cancer du sein<sup>66,74</sup>. En revanche, HSulf-2 est considérée comme suppresseur de tumeurs du myélome<sup>76</sup>, du cancer du rein<sup>73</sup> et gastrique.<sup>59</sup>

#### 5.3.4 Autres pathologies associées

Des travaux ont par la suite été menés pour connaître les autres rôles biologiques des Sulfs hors cancers. On peut citer brièvement le rôle des Sulfs dans la régulation de la signalisation du développement comme vu précédemment.<sup>83</sup> HSulf-1 est également exprimée dans le muscle œsophagien exprimant le GDNF (Glial Cell Derived Neurotrophic Factor) et HSulf-2 dans les neurones innervants, établissant leur fonction directe dans l'innervation œsophagienne.<sup>84</sup> Ces constatations fournissent la première preuve *in vivo* que les Sulfs sont des régulateurs essentiels pour la transmission matricielle et la réception du signal GDNF du muscle aux neurones innervants *via* la modulation de la 6-O-sulfatation de HS.

Les Sulfs sont exprimées dans le cartilage articulaire et il a été montré que les souris dont l'expression de HSulf-1 est bloquée développent une arthrose sévère du genou.<sup>39</sup> En 2017, pour agir sur cette pathologie, Otsuki S et al.<sup>85</sup> ont montré que l'injection intra-articulaire de HSulf-1 empêche la dégénérescence du cartilage dans un modèle d'arthrose chez la souris. Cet effet serait dû à une augmentation de l'expression du collagène de type II et à la diminution de

l'expression de la métalloprotéinase matricielle (MMP-13, collagénase) d'une manière dépendante de la concentration de Sulf-1 injectée. L'injection de Sulf-1 dans le genou ostéo-arthritique de souris a significativement atténué la diminution de GAGs et l'expression de MMP-13. Cet effet peut s'expliquer par l'atténuation de la voie de signalisation Erk1 / 2 (Extracellular signal-regulated kinases, des kinases, qui phosphorylent des protéines afin de les activer) impliquant FGF-2, sous l'effet de l'action de Sulf-1. Ces découvertes indiquent que Sulf-1 prévient la dégénérescence du cartilage en supprimant la MMP-13 *via* un effet sur la signalisation FGF2 / Erk1 / 2.<sup>85</sup> Une étude en 2019 a montré que les changements dans la 6-O-sulfatation ont un impact sur les voies de signalisation du cartilage. Ces changements dans la structure de l'HS sont susceptibles d'avoir des effets sur la santé des articulations et la progression de l'arthrose.<sup>86</sup> Plus récemment, en 2020, une étude suggère qu'un niveau de sulfatation réduit protège contre la progression de l'arthrose en régulant l'activité des protéases.<sup>87</sup>

Le diabète pourrait également faire intervenir les HSulfs. Ainsi, la surexpression hépatique de HSulf-2 a été relevée dans des modèles murins de diabète de type 2 et chez des patients diabétiques de type 2 (DT2) et /ou obèses.<sup>88,89</sup> Il a été proposé que, chez l'Homme, la surexpression de HSulf-2 interfère dans la clairance postprandiale des lipoprotéines riches en triglycérides.<sup>89</sup> De plus, l'inhibition de HSulf-2 réduit l'hypertriglycéridémie post-prandiale et rétablit la capacité des hépatocytes à lier les VLDL (very low density lipoproteine). Ceci fait de HSulf-2 une cible thérapeutique particulièrement attrayante pour améliorer la dyslipidémie athérogène dans le DT2 et l'obésité qui se caractérise par de faibles taux de lipoprotéines de haute densité (HDL), de hauts niveaux de triglycérides et un nombre élevé de particules de lipoprotéines de basse densité (LDL)<sup>88</sup>.

Dans toutes les pathologies citées précédemment, l'effet de HSulf-2 passe par son action sur les GAGs et ainsi la modulation des facteurs protéiques qui, eux, sont directement impliqués dans la pathologie.

La surexpression des sulfatases en général peut conduire à des pathologies plus ou moins lourdes mais il en va de même pour un défaut de ces enzymes. L'absence d'activité sulfatase peut conduire à des troubles héréditaires variés (tableau 2).<sup>2,90</sup>

**Tableau 2 : Troubles héréditaires résultant d'une carence en une seule sulfatase.**<sup>2,90</sup>

MPS = Mucopolysaccharidose, RE = réticulum endoplasmique

| <b>Localisation subcellulaire</b> | <b>Sulfatase</b> | <b>Pathologie</b>                        |
|-----------------------------------|------------------|--|
| <b>Lysosome</b>                   | ARSA             | Métachromatique<br>Leucodystrophie (MLD) |
|                                   | IdoAS            | Maladie de Hunter (MPS II)               |
|                                   | GlcNS            | Sanfilippo A (MPS IIIA)                  |
|                                   | GlcN6S           | Sanfilippo B (MPS IIIB)                  |
|                                   | GalN6S           | Morquio A (MPS IVA)                      |
|                                   | ARSB             | Maroteaux-Lamy (MPS VI)                  |
| <b>RE, Golgi</b>                  | ARSC             | Ichtyose liée à l'X (XLI)                |
|                                   | ARSE             | Chondrodysplasie ponctuée (CDPX)         |

Les Sulfatases sont donc des enzymes clés, indispensables pour le développement mais, mises en jeu dans les pathologies graves.

Définir leurs structures et leurs mécanismes d'action est un enjeu important pour la compréhension de leur fonctionnement, et notamment pour la découverte d'inhibiteurs. Quelles

sont les différences structurales entre les deux Sulfs qui conduisent à une telle différence d'action biologique ?

#### 5.4 Une structure difficile à caractériser

Concernant la structure, c'est en 2005 que les premières données sur les Sulfs sont apportées. On détermine ainsi la présence de deux domaines, une partie N-terminale avec un peptide signal responsable de la sécrétion en milieu extracellulaire et un domaine appelé HD pour « hydrophilic domain » localisé entre le domaine catalytique et la partie C-terminale. Ces propriétés font des Sulfs des protéines significativement plus longues que les autres sulfatases humaines connues, avec lesquelles elles partagent néanmoins une forte homologie de séquences (Fig 5.A).<sup>91</sup> Ce domaine HD a une structure prédite de type *coiled-coil* et est uniquement présent chez les HSulfs. Nous avons donc ici les prémices de particularités structurales des Sulfs qui ont été mises à jour au cours de la dernière décennie et qui les rendent uniques parmi les sulfatases et les enzymes en général.

C'est 4 ans plus tard, en 2009, qu'une étude démontrera le rôle de ce domaine HD. La suppression de la région HD augmente considérablement la sécrétion de HSulf-1. Cette étude n'a été réalisée que sur HSulf-1. Prise dans son ensemble, elle montre que la région HD influence différents aspects de la liaison aux héparanes sulfate, la localisation cellulaire et la fonction enzymatique.<sup>92</sup>

On découvre également la présence d'un résidu conservé entre les différents orthologues de Sulfs qui semble donc être un résidu catalytique important pour l'activité de la protéine.<sup>91</sup> (Fig 5.B). Ce résidu nommé formylglycine donne son nom à une grande famille de sulfatases appelées les hydro-FGly-sulfatases dont les Sulfs font partie.

Les hydro-FGly-sulfatases constituent 89,25% des sulfatases recensées dans la base de données Uniprot.<sup>5</sup> Identifiées chez les procaryotes et les eucaryotes, elles sont le seul type de sulfatases connu à ce jour chez les mammifères.<sup>8</sup> L'activité des hydro-FGly-sulfatases dépend de la présence dans leur site actif du résidu catalytique unique C $\alpha$ -formylglycine (FGly), appelé également 3-oxoalanine.<sup>6</sup> Il s'agit d'un aldéhyde formé par oxydation de la chaîne latérale d'une cystéine ou d'une sérine située dans le motif consensus hautement conservé (C/S)-X-P-X-R-X-X-X-L-T-G-R.

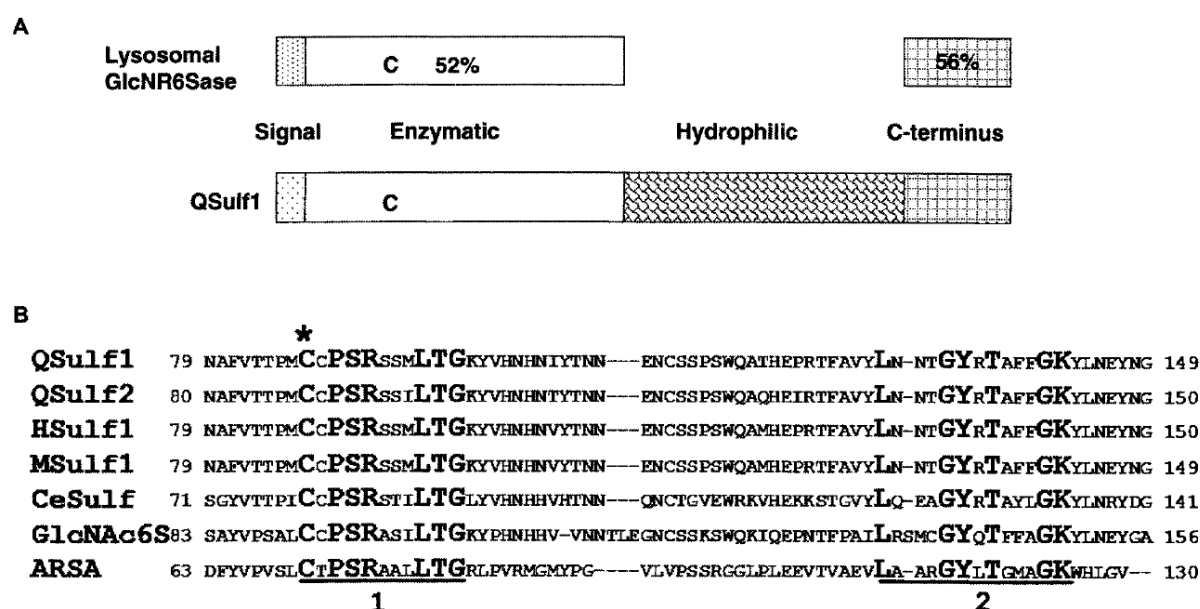


Figure 5: Homologie de séquence et de structure des domaines pour les Sulfatases lysosomales et les Sulfs de plusieurs espèces.<sup>91</sup>

(A) homologie des domaines, (B) homologie de deux séquences signatures du site catalytique indiquées 1 et 2, conservé chez toutes les sulfatases.

L'étude de la séquence et des modifications post-traductionnelles a mené aux premières découvertes sur la *N*-glycosylation de QSulf1 en 2007. Cinq sites de *N*-glycosylation ont été prédits dans le domaine N-terminal et deux dans le domaine C-terminal. Cette étude a montré que ces sept sites de *N*-glycosylations jouent un rôle important dans la fixation avec les

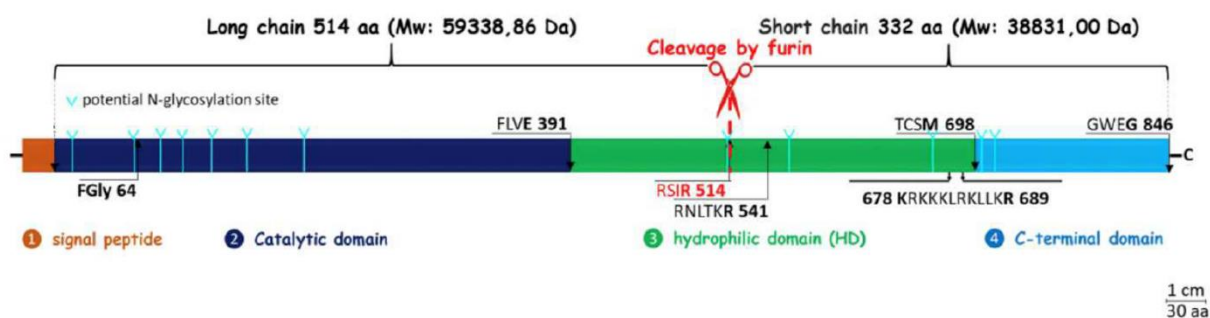
héparanes sulfate et l'activité 6-*O*-endosulfatase. Ces découvertes ont été faites en traitant *in vitro* des cellules avec de la tunicamycine, un antibiotique qui inhibe l'enzyme GlcNAc phosphotransferase (GPT). Elle inhibe ainsi la *N*-glycosylation nécessaire à la fixation des précurseurs des *N*-hétérosides sur le dolichol diphosphate et donc la synthèse des *N*-glycanes.<sup>93</sup> Le mécanisme expliquant l'importance des *N*-glycanes pour l'activité sulfatase de QSulf-1 n'est à ce jour pas résolu, cependant on peut faire l'hypothèse que les *N*-glycanes sont nécessaires pour maintenir un repliement de la protéine et donc une conformation du site actif qui le rendrait apte à la fixation du substrat et à la catalyse de la désulfatation.

Les modifications post-traductionnelles sont donc un axe d'étude pour comprendre les différents aspects fonctionnels des sulfatases humaines (interaction, catalyse, etc.).

La connaissance de la structure des Sulfs a progressé avec la compréhension de leur biosynthèse. Les deux Sulfs humaines sont synthétisées sous forme de pre-pro-enzymes, clivées ensuite par une protéinase de type furine pour former un hétérodimère probablement lié par des ponts disulfure. Pour HSulf-2, les deux sous-unités feraient 75 kDa (chaîne longue) et 50 kDa (chaîne courte) (Fig 6).<sup>94</sup> Bien que le site catalytique réside dans la sous-unité N-terminale de 75 kDa, la sous-unité C-terminale de 50 kDa est indispensable à l'activité endosulfatase et arylsulfatase.

De toutes les hydro-Fgly-Sulfatases, les Sulfs sont les seules sulfatases bicaténaires.<sup>95</sup>





**Figure 6 : Structure schématique de HSulf-2. (D'après I. Seffouh) <sup>94</sup>**

Le peptide signal de 24 aa est représenté en orange, le domaine catalytique de 391 aa en bleu foncé, le domaine hydrophile basique de 307 aa en vert et enfin la partie C-terminale de 148 aa est représenté en bleu. Le résidu comportant la formylglycine est représenté en position 64. RSIR 514 constitue le principal site de coupure par la furine, 535 RNLTKR 541 constitue le site de coupure secondaire par la furine. 678 KRKKKLRKLLKR 689 correspond aux 12 aa conservés parmi les vertébrés. Les sites potentiels de N-glycosylation sont représentés par des flèches bleu clair. Les résidus d'acides aminés sont numérotés à partir du premier résidu d'acide aminé de la protéine sécrétée.

L'analyse par Western Blot des HSulfs exprimées avec des étiquettes (His/FLAG) permettant leur immuno-détection, en conditions réductrices et non-réductrices, a confirmé la présence de ponts disulfure dans la forme mature de HSulf. En effet, en conditions non réductrices HSulf-2 montre une bande à 125 kDa, alors qu'en conditions réductrices deux chaînes sont détectées par Western Blot. <sup>95</sup> Ces chaînes sont donc potentiellement reliées par des ponts disulfure, mais à ce jour, leurs positions sont inconnues. 23 cystéines sont présentes dans la séquence peptidique de HSulf-2 et pourraient donc former au moins un pont entre les chaînes. <sup>96</sup> Parmi ces 23 cystéines, 22 sont conservées dans la séquence peptidique de HSulf-1 ce qui suggère que la position des ponts disulfure pourrait être similaire.

La masse moléculaire théorique déduite de la séquence en acides aminés de la pro-protéine HSulf-2 (HSulf-2 sans le peptide signal) est de 98 151 Da. La maturation par la furine engendre deux chaînes, l'une de 59 338 Da (chaîne longue) et l'autre de 38 831 Da (chaîne courte). Expérimentalement, les analyses par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions non-réductrices et la détection par immunoblot de la protéine montrent une bande à environ 250

kDa, qui peut s'expliquer par la formation de dimères de HSulf-2, <sup>21,95</sup> ainsi que des bandes à 132 kDa <sup>21</sup> et 125 kDa <sup>95</sup> attribuées à des monomères de la protéine entière. Enfin, en conditions réductrices, on peut observer des bandes à 75 et 50 kDa attribuées à la chaîne longue et la chaîne courte respectivement. <sup>95</sup>

Les différences de masse théorique calculées *versus* expérimentales de 98 à 132 kDa pour HSulf-2 entière, de 59 à 75 kDa pour la chaîne lourde et de 39 à 50 kDa pour la chaîne légère, pourrait être expliquées par la *N*-glycosylation. La *N*-glycosylation a lieu dans le réticulum endoplasmique (RE), sur les séquences consensus Asn-Xaa- (Ser / Thr). <sup>97</sup> En 2002, on compte 10 et 11 sites potentiels de *N*-glycosylation pour HSulf-1 et HSulf-2 respectivement distribués sur les deux chaînes. Cette prédiction a été faite à partir des séquences d'ADNc car les séquences primaires de HSulf-1 et HSulf-2 n'étaient pas connues. <sup>21</sup> En 2019, une nouvelle prédiction pour HSulf-2 annonce 12 sites potentiels de *N*-glycosylation. <sup>94</sup>

En plus de la *N*-glycosylation sur les résidus asparagine, d'autres types de glycosylation peuvent intervenir, comme par exemple la *O*-glycosylation avec des chaînes de sucres liées aux résidus sérine / thréonine. Cependant, aucune position n'est prédite pour la *O*-glycosylation ou la présence de chaînes de sucre liées à la sérine pour Sulf. <sup>92</sup> Toutefois le traitement enzymatique de HSulf-2 par une *N*-glycosidase conduit à la détection après Western Blot d'une bande à ~100 kDa, une diminution de masse indiquant que HSulf-2 est effectivement *N*-glycosylée. <sup>21</sup> La *N*-glycosylation peut être essentielle pour le repliement des protéines, la stabilité, le transport intracellulaire, la sécrétion et l'activité. A ce jour, la localisation, la nature et le rôle des chaînes de *N*-glycane présentes sur les HSulfs ne sont pas déterminés.

Différentes données ont été produites pendant la dernière décennie pointant le rôle des domaines spécifiques et celui des deux chaînes dans l'interaction avec le substrat et dans les propriétés catalytiques. Il a été ainsi constaté que le domaine HD des Sulfs était essentiel pour

l'activité endosulfatase, mais pas pour l'activité arylsulfatase. En utilisant le séquençage d'Edman, des sites de clivage de la protéinase de type furine dans HSulf-1 et HSulf-2 ont été identifiés. La suppression de ces séquences a entraîné la synthèse de formes monocaténares des Sulfs. Les Sulfs non clivées ont conservé leurs activités enzymatiques. Cependant, elles ne pouvaient pas réguler la signalisation de Wnt. Cela pourrait être dû à leur localisation sur la membrane plasmique car l'hypothèse est que l'action des HSulfs sur la voie Wnt serait due à la libération de ligand Wnt fixés aux HSPGs sur la membrane cellulaire. <sup>95</sup>

La double activité enzymatique des Sulfs ne semble donc pas être dépendante de la localisation cellulaire de ces enzymes ou de la présence du domaine HD pour HSulf-1. Est-ce vraiment le cas et est-ce la même chose pour HSulf-2 ?

## 5.5 L'importance des domaines dans l'activité enzymatique

### 5.5.1 Une double activité, endosulfatase et arylsulfatase

Les sulfatases hydrolysent les esters de sulfate sur une grande variété de molécules, y compris les glycosaminoglycanes, les sulfoglycolipides et les stéroïdes cytosoliques. Ces enzymes se trouvent dans une large gamme d'organismes avec un mécanisme enzymatique fortement conservé. Chez les mammifères, de nombreuses sulfatases se localisent dans le lysosome et présentent *in vivo* une activité enzymatique sur de petits substrats aryles tel que le sulfate de 4-méthylumbelliféryle (4-MUS). <sup>98</sup> Elles sont connues sous le nom d'arylsulfatases. HSulf-1 et HSulf-2 ont été clonées et identifiées comme des endosulfatases qui libèrent des groupements sulfate sur la position C-6 du résidu GlcNAc des polysaccharides de HS. Cependant, les HSulfs ont également montré leur capacité à désulfater de petits substrats aryles et présentent donc une double activité endosulfatase et arylsulfatase. <sup>98</sup>

Evolutivement, cette capacité peut être expliquée par leur séquence primaire. Les deux types d'enzyme possèdent une forte homologie de séquence, à l'exclusion du domaine HD qui est sans précédent chez les arylsulfatases. On pourrait dire que les 6-O-endosulfatases sont des arylsulfatases avec un domaine HD supplémentaire. En effet, les séquences consensus des arylsulfatases sont toutes conservées dans la séquence de HSulf-2.<sup>3</sup> On peut prendre l'exemple de la dernière arylsulfatase découverte, l'arylsulfatase K ou ARSK.<sup>4</sup> Cette sulfatase possède une homologie de séquence de 25.7% avec HSulf-2 sur la partie C-terminale (Fig 7).<sup>99</sup>



Figure 7 : alignement de séquence de l'arylsulfatase K et HSulf-2 selon UniProtKB

L'équipe de Rosen publia en 2006 la première étude d'activité des HSulfs sur le 4-methylumbelliferyl sulfate (4-MUS), un substrat synthétique devenant fluorescent après désulfatation. Le protocole de mesure à pH basique qu'ils ont établi est encore à ce jour très utilisé pour caractériser l'activité arylsulfatase.<sup>98</sup> Ils ont également réalisé un suivi enzymatique

par phage display quatre ans plus tard.<sup>100</sup> Ces articles ont montré une activité de 1000-2000 nmole/min/mg de HSulf-2 sur le 4-MUS,<sup>21</sup> activité arylsulfatase non négligeable mais faible en comparaison de celle d'une arylsulfatase comme la ARSB qui est à 48000 nmole/min/mg d'enzyme.<sup>101</sup>

Les Sulfs sont les seules hydro-FGly-sulfatases qui ont une action directe sur des chaînes intactes de HS à la différence des hydro-Fgly-sulfatases lysosomales.<sup>21,102</sup> Par ailleurs, contrairement aux autres sulfatases, les HSulfs sont des endo-enzymes qui agissent sur les groupes 6-*O*-sulfate à l'intérieur des chaînes de HS. En 2011, le groupe de Staples a montré que HSulf-2 a une activité processive. En effet, elle désulfate préférentiellement à partir de l'extrémité non réductrice et progresse le long de l'enzyme.<sup>103</sup> En 2013, le groupe de RR. Vivès a confirmé ce résultat et montré que la désulfatation catalysée par Sulf commençait toujours à l'extrémité non réductrice des domaines sulfatés des HS et progressait vers l'extrémité réductrice du domaine de manière processive.<sup>104</sup> Cela implique que le domaine HD se lierait à un motif saccharidique en aval de l'extrémité non réductrice du domaine sulfaté pour s'adapter de manière adéquate à la première glucosamine 6-*O*-sulfatée dans le site actif.

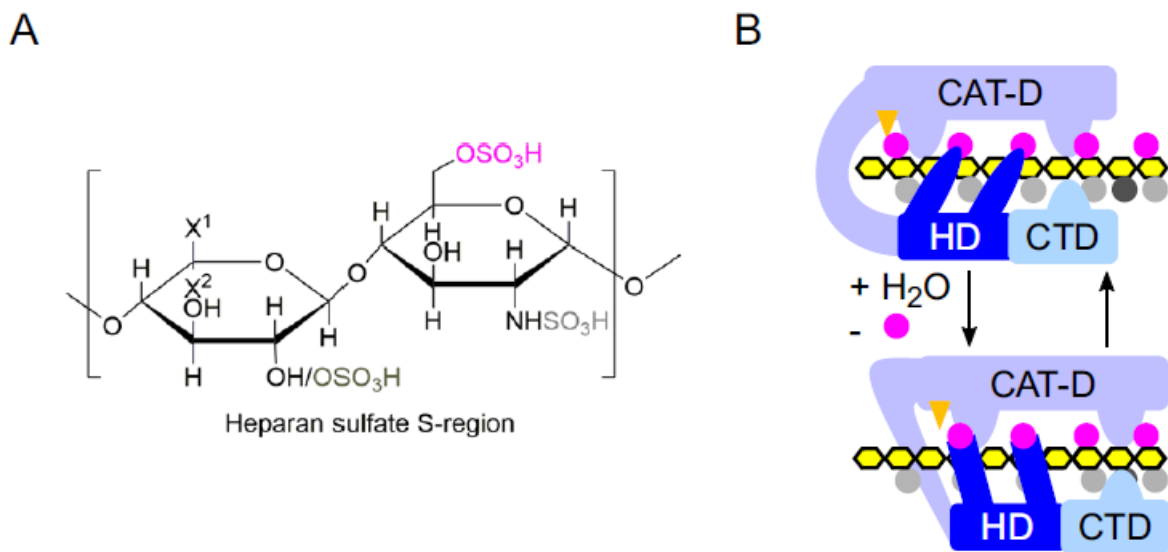
### 5.5.2 Le rôle du domaine hydrophile

En 2009, le groupe de Frese a réalisé des travaux sur le rôle du domaine hydrophile dans l'activité enzymatique. Ces analyses ont permis de générer un modèle de l'interaction entre héparane sulfate et site catalytique de HSulf-2. Le modèle propose que deux sites de liaison aux HS seraient présents sur le domaine HD. Sur la base de cette hypothèse, des constantes de dissociation ont pu être calculées pour les deux sites avec des valeurs de  $K_{D1}$  0.6 nM et  $K_{D2}$  17 nM.<sup>92</sup> Une constante de l'ordre du nanoMolaire indique une forte affinité envers le substrat. Pour comparaison, HSulf-2 possède une affinité de l'ordre du millimolaire avec le substrat synthétique de type aryle, 4-MUS qui est donc un moins bon substrat pour l'enzyme.<sup>98</sup>

Comme vu précédemment la chaîne longue formée à la suite du clivage par la furine contient le domaine N-terminal avec le site catalytique et son résidu C $\alpha$ -formylglycine ainsi qu'une partie du domaine HD. La chaîne courte contient la majorité du domaine HD ainsi que le domaine C-terminal (Fig 6).

Lorsque la chaîne longue avec le résidu C $\alpha$ -formylglycine est exprimée seule, elle n'a aucune activité enzymatique. En effet, on n'observe ni activité arylsulfatase ni endosulfatase. On peut donc supposer que la poche catalytique n'est pas le seul facteur limitant à l'activité enzymatique. En revanche, lorsque la partie N-terminale de la chaîne longue est exprimée avec le domaine C-terminal sans domaine HD, la protéine ne montre pas d'activité endosulfatase mais conserve une activité arylsulfatase.<sup>95</sup> Il semblerait donc que ce domaine HD soit indispensable à l'activité endosulfatase, mais facultatif pour l'activité aryl.

En 2018, l'équipe de Dierk a étudié ce mouvement processif par microscopie à force atomique (AFM) sur l'isoforme HSulf-1. Ils ont proposé un modèle hypothétique, selon lequel le domaine HD se lierait à une glucosamine sulfatée en position 6 dans les régions trisulfatées des chaînes d'héparine sulfate. Toujours selon ce modèle, les HS pourraient former des interactions additionnelles avec les domaines catalytique et C-terminal. La 6-*O*-désulfatation au site actif de HSulf-1 pourrait induire un passage à un état tendu dans lequel HD et HS interagissent avec une haute affinité. Bien que les détails structuraux soient inconnus, un changement conformationnel associé pourrait potentiellement faciliter la progression de HSulf-1 vers le prochain résidu 6-*O*-sulfaté dans les régions hautement sulfatées de HS (Fig 8).<sup>105</sup>



**Figure 8: Modèle de la fixation de HSulf-1 au substrat héparane sulfate** <sup>106</sup>

(A) Unités disaccharidiques hautement sulfatées les régions S d'héparane sulfate consistent en un acide uronique (soit de l'acide iduronique : X1 = H et X2 = COOH ou acide glucuronique : X1 = COOH et X2 = H, avec ou sans 2-O-sulfatation (gris foncé)) 1-4 lié à une glucosamine. La N-sulfatation (gris clair) est uniforme et la 6-O-sulfatation (magenta) du résidu glucosamine est prédominante. (B) Modèle de l'héparane sulfate 6-O-désulfatation par HSulf-1. Le domaine hydrophile (HD) de HSulf-1 (bleu foncé) se lie aux sites 6-O-sulfatés (magenta) dans les régions S hautement sulfatées de l'héparane sulfate (HS, jaune). Des contacts supplémentaires entre l'héparane sulfate et le domaine catalytique (CAT-D) et le domaine C-terminal (CTD) de HSulf-1 peuvent être formés. La 6-O-désulfatation au site actif de HSulf-1 est représenté en orange. Les groupes N-sulfate (points gris clair) et les groupes 2-O-sulfate (points gris foncé) de HS sont indiqués.

### 5.5.3 Rôle du site catalytique

La poche catalytique des six hydro-FGly-sulfatases humaines dont la structure est caractérisée, est formée de la formylglycine catalytique et neuf autres résidus conservés. Parmi ces résidus, quatre sont impliqués dans l'association à un ion calcium qui va lier et activer le groupement sulfate du substrat et cinq autres acides aminés stabilisent le résidu formylglycine.

Il a été suggéré que les résidus qui forment la poche catalytique avec une activité arylsulfatases proviennent de la partie N-terminale de la chaîne longue et de la partie C-terminale de la chaîne courte et ne sont dans aucun cas dans le domaine HD.

Au cœur de ce site catalytique, deux autres sites de fixation au substrat HS ont été découverts chez HSulf-2 par l'équipe de Romain Vives en 2019.<sup>106</sup> A l'aide d'un système de production et de purification optimisé pour la protéine sous forme recombinante, ils ont pu réaliser des tests de fixation par résonance plasmonique de surface (SPR). Les auteurs identifient dans le site catalytique deux sites de liaison à HS correspondant à deux peptides : <sup>155</sup>VKEK<sup>158</sup> et <sup>377</sup>LKKK<sup>380</sup> numérotés sans prendre en compte le peptide signal de 24 résidus. L'expression de HSulf-2 avec des mutants simples et doubles de ces peptides (mutant simple : des résidus alanines remplacent les lysines sur un peptide, mutants doubles : des résidus alanines remplacent les lysines sur les deux peptides) a montré que ces acides aminés ne sont pas nécessaires pour l'activité endosulfatase. Les mutants simples de HSulf-2 conservent leur activité endosulfatase sur l'héparine mais le mutant double a une perte considérable d'activité sur l'héparine. Parmi toutes les sulfatases, ces deux motifs sont uniquement conservés chez les isoformes HSulfs, ce qui suggère qu'ils jouent un rôle dans l'activité spécifique de ces enzymes.<sup>106</sup>

En résumé, HSulf-1 et HSulf-2 sont des sulfatases qui modifient l'état de sulfatation des protéoglycanes d'héparane sulfate (HSPG) à l'extérieur des cellules et régulent un certain nombre de voies de signalisation critiques. Les Sulfs sont dérégulées dans de nombreux cancers, HSulf-2 étant considérée comme pro-oncogène dans plusieurs cancers. Malgré l'étendue des recherches effectuées et l'accumulation des connaissances sur ses 20 dernières années, leur processus de fonctionnement et leurs structures détaillées restent irrésolus. Il est donc nécessaire de les caractériser afin d'ouvrir des pistes de traitements comme par exemple la conception d'inhibiteurs. C'est dans ce contexte que s'inscrivent mes travaux de thèse.



## Et aujourd'hui ? Objectif de thèse

Les deux endosulfatases HSulf-1 et HSulf-2 agissent sur le même type de substrat, HS, les protéoglycanes à héparane sulfate (HSPG) et ont la même localisation, à la surface cellulaire et la matrice extracellulaire.<sup>21,107</sup> Cependant, puisqu'elles présentent des différences fonctionnelles d'un point de vue physiopathologique, elles devraient présenter des différences structurales que nous pourrions exploiter. Lors de nos travaux nous nous sommes focalisés sur la caractérisation de HSulf-2 qui semble être la forme ayant le plus d'effets physiopathologiques néfastes afin d'orienter la conception d'inhibiteurs spécifiques de cette enzyme.

### 6.1 Caractérisation des modifications post-traductionnelles

### 6.2 La *N*-glycosylation

Comme vu précédemment il a été observé, après l'utilisation d'une *N*-glycosidase, une différence de masse moléculaire apparente de HSulf-2 en SDS-PAGE. Des hypothèses ont été faites sur les sites de *N*-glycosylation de HSulf-2 en utilisant une observation différentielle de la couverture de séquence avec et sans action d'une glycosidase. Douze emplacements potentiels de *N*-glycosylation (motif N-X-S/T, X/=P) ont été identifiés sur les deux chaînes. Une combinaison de déglycosylation et d'analyse protéomique avait précédemment indiqué qu'au moins 4 des 12 sites potentiels étaient glycosylés. Notre objectif est donc d'identifier ces sites de façon directe et de découvrir la structure de ces N-glycanes et leur implication dans l'activité de HSulf-2.

### 6.3 Les ponts disulfure

Des équipes ont tenté de caractériser la structure tridimensionnelle de HSulf-2 par analyse cristallographique. Cependant, en raison de la présence du domaine HD qui est désorganisé, il a été à ce jour impossible d'obtenir un cristal diffractant.<sup>108</sup> Nous n'avons donc aucune connaissance de la manière dont les deux chaînes sont reliées et organisées.

La séquence protéique de HSulf-2 comprend vingt-trois résidus cystéines dont certains sont impliqués dans des liaisons disulfure comme indiqué par la variation de masse en MALDI-TOF<sup>96</sup> et SDS-PAGE<sup>96</sup> dans des conditions réductrices et non réductrices. Les cystéines impliquées dans la formation des ponts disulfure de HSulf-2 ne sont pas identifiées. Nous supposons que HSulf-2 forme au moins un pont disulfure reliant les deux chaînes. Au cours de ces travaux de thèse nous allons tenter de mettre en évidence ces ponts disulfure pour en savoir plus sur l'organisation tridimensionnelle de cette protéine.

### 6.4 Une modification unique découverte, un glycosaminoglycane

Depuis plusieurs années, le LAMBE mène un programme de recherche visant à élucider l'organisation structurale des Sulfs dans le cadre d'un projet ANR en collaboration avec le groupe SAGAG de l'IBS à Grenoble. Dans le cadre de cette ANR une analyse de HSulf-2 par diffusion de rayons X aux petits angles (Small Angle X-rays Scattering, SAXS) réalisée par l'équipe du Dr. RR. Vivès sur la plateforme BM29 BioSAXS (European Synchrotron Radiation Facility –ESRF), a révélé une enveloppe protéique de forme globulaire portant une extension assez allongée.<sup>50</sup> Ce modèle suggère que HSulf-2 possède un rayon hydrodynamique important et expliquerait l'élution très rapide de l'enzyme lors de l'analyse en chromatographie d'exclusion stérique. Une hypothèse a été émise, selon laquelle HSulf-2 serait isolée et co-purifiée avec un composant de la matrice extracellulaire. La matrice extracellulaire est le siège de l'activité enzymatique de HSulf-2, elle est constituée de plusieurs catégories de molécules :

des glycosaminoglycanes (GAG), des protéoglycanes (PG), des glycoprotéines, des protéines fibreuses (PF) et des lipides. Les analyses de HSulf-2 par SDS-PAGE effectuées par notre équipe n'ont permis de ne visualiser qu'une seule bande de nature protéique, attribuée à la chaîne longue, ce qui nous permet raisonnablement d'exclure la présence dans des proportions notables d'autres composés de nature protéique qui seraient co-purifiés avec HSulf-2. Ceci sous réserve qu'ils ne soient pas insensibles à la coloration au bleu de Coomassie. Compte tenu de ce résultat, l'hypothèse retenue est que HSulf-2 pourrait être liée à un composant de la matrice extracellulaire de type glycosaminoglycane. En parallèle de cela, la thèse d'Ilham Seffouh <sup>96</sup> effectuée au sein de notre laboratoire a permis de confirmer cette hypothèse. C'est sur ces données ci-dessous que nous nous sommes appuyés pour réaliser les travaux exposés dans ce manuscrit.

1. L'analyse en gel avec double coloration spécifique des polyanions a permis de confirmer que la modification arborée par HSulf-2 est de type polyanionique
2. La mise en contact avec HSulf-2 de différentes enzymes digérant les GAGs permet de conclure que la chaîne de GAG serait de nature chondroïtine sulfate / dermatane sulfate
3. Cette modification est responsable de la masse apparente très élevée de HSulf-2 sur gel de polyacrylamide
4. L'analyse MALDI-TOF et l'analyse C-PAGE avant et après digestions par des chondroïtinases permettent de conclure que la chaîne de GAG posséderait une masse moléculaire d'environ 24,7 kDa
5. Cette chaîne de GAG ne semble être présente que sur l'iso forme HSulf-2 et non HSulf-

1

HSulf-2 est donc la seule enzyme porteuse d'un GAG connue chez l'Homme à ce jour, qui en plus aurait elle-même les GAGs pour substrat. Cette découverte entraîne de nombreuses

questions. Pourquoi HSulf-2 est-elle liée à un GAG et non HSulf-1 ? Ce GAG a-t-il une structure particulière ou la structure des proteoglycanes classiques ? Y a-t-il un lien entre les différences de fonctions entre les deux formes et la présence de ce GAG ? Le travail de la thèse exposé dans ce manuscrit a cherché à apporter des réponses à toutes ces nouvelles interrogations.

## 6.5 Particularité du modèle d'HSulf-2 étudié

Pour répondre à ces questions, nous avons analysé la protéine recombinante HSulf-2 exprimée dans des cellules humaines HEK 293, puis purifiée selon la méthodologie d'écrite par Seffouh *et al.* <sup>50,106</sup>

La protéine utilisée au cours de nos travaux présente une séquence appelé SNAP en position N-terminale et une étiquette histidine (HisTag) en position C-terminale, nécessaires pour la purification de l'enzyme. Ces deux extensions sont reliées à la protéine par de courtes séquences qui sont des sites de coupure par la protéase TEV (Fig 9)



Figure 9 : Schéma de HSulf-2 SNAP-TAG

Les parties N-terminal et C-terminal portent le SNAP (jaune) et le tag Histidine (gris) respectivement. C'est deux parties sont reliées à la protéine par un site de coupure par la protéase TEV (rose). Le site catalytique est représenté en bleu avec son résidu catalytique FGly (étoile). Le domaine HD est représenté en marron.

Étant donné la présence de ces extensions la masse moléculaire théorique de la protéine par sa séquence en acide aminés se trouve accrue (Tableau 3).

**Tableau 3 : Tableau des masses moléculaires théoriques de HSulf-2 SNAP/TAG**

Étiquettes : N-terminal = séquence de coupure à la protéase TEV + peptide SNAP de 21 600 Da et C-terminal = séquence de coupure à la protéase TEV + His-TAG 2 200 Da

|                                   | Masse moyenne (Da) |               |               |
|-----------------------------------|--------------------|---------------|---------------|
|                                   | HSulf-2 entière    | Chaîne longue | Chaîne courte |
| Séquence primaire sans étiquettes | 98 151             | 59 338        | 38 831        |
| Séquence primaire avec étiquettes | 121 951            | 80 938        | 41 031        |

Toutes les expériences effectuées au cours de cette thèse ont été réalisées sur ce modèle de HSulf-2, purifiée par le groupe SAGAG à l'Institut de Biologie Structurale (IBS) de Grenoble dans le cadre du projet ANR Sulfatase.

## **Chapitre 2 : Caractérisation structurale d'une modification post-traductionnelle unique de HSulf-2 : une chaîne de glycosaminoglycane**

Une modification post-traductionnelle de HSulf-2 très rare, une chaîne de glycosaminoglycane (GAG) ayant une masse d'environ 24,7 kDa, a été mise en évidence lors de travaux antérieurs à cette thèse en collaboration avec l'Institut de Biologie Structurale (IBS) de Grenoble.<sup>50,96,109</sup> En effet, HSulf-2 est la seule sulfatase humaine connue à porter cette modification. Caractériser cette chaîne de GAG au niveau structural permettrait de mieux comprendre son rôle et les conséquences de sa présence sur HSulf-2. Dans ce travail nous étudierons la nature de cette chaîne de GAG unique pour une enzyme et déterminerons sa composition. Nous avons pour cela utilisé une combinaison de techniques aussi bien biochimiques, que spectrochimiques (spectrométrie de masse et résonance magnétique nucléaire).

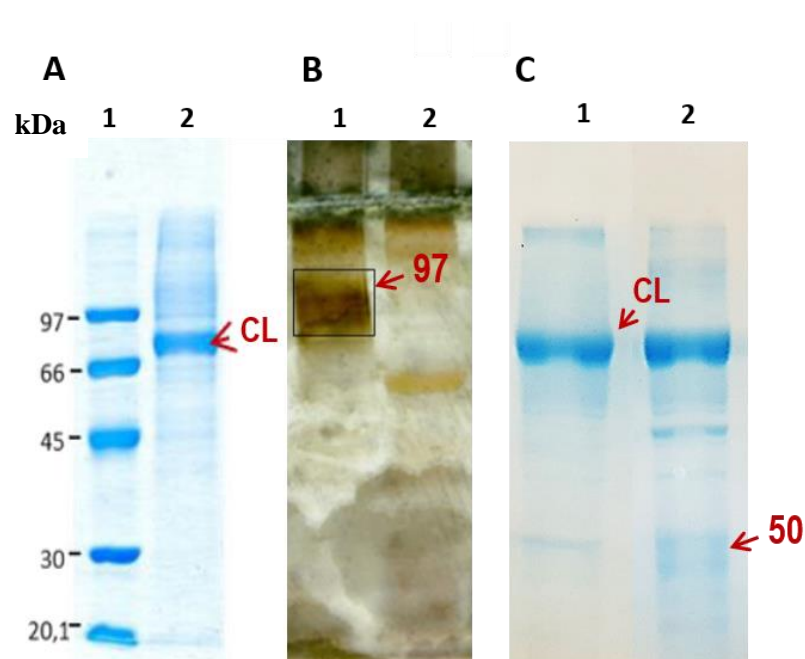
## 7.1 Mise en évidence et caractérisation de la structure de liaison HSulf-2/GAG

Les chaînes de GAG sont reliées au core protéique des protéoglycanes par un bras tétrasaccharidique appelé « linker » dont la structure varie selon le type de glycosaminoglycanes.<sup>110</sup> Pour les chondroïtines, ce linker est de type Xyl-(Gal)<sub>2</sub>-GlcA et est attaché au résidu sérine (Ser) du motif conservé sérine-glycine (SG).<sup>111</sup>

Les chaînes de GAGs liées aux protéoglycanes (PG) influencent les propriétés et les fonctions de ces derniers. Ces PG régulent des mécanismes physiologiques et pathologiques comme par exemple l'homéostasie des tissus ou le développement embryonnaire par des voies de signalisation cellulaire<sup>112</sup> décrites dans le chapitre 1.3. Les longues chaînes de GAGs poly-anioniques permettent l'interaction avec de nombreuses molécules, notamment celles impliquées dans les voies de signalisation. HSulf-2 est la première enzyme humaine connue à présenter une telle modification. Pourquoi une enzyme aurait-elle besoin d'arborer une chaîne poly-anionique linéaire ? Cette modification post-traductionnelle est-elle structurée comme celle d'un protéoglycane classique, en particulier avec un linker ? Si oui, la structure de ce linker est-elle la même que pour les protéoglycanes ? Et enfin quelles sont les conséquences de la présence de ce GAG pour HSulf-2 ? Ce GAG influence-t-il sa structure, son interaction avec le substrat ou encore son activité catalytique ?

Bien que nous ayons observé la présence d'un GAG sur HSulf-2, nous n'en n'avons jamais effectué la détection directement sur la protéine, ce qui nous permettrait de le localiser et le caractériser. Identifier la structure du linker pourrait nous donner des informations sur l'élongation de la chaîne et orienter notre réflexion vis-à-vis des questions évoquées ci-dessus. Notre premier objectif est donc de détecter le linker. Cela permettrait de confirmer le site SG comme localisation de la chaîne de GAG et d'en identifier la structure.

Deux motifs SG sont présents dans la séquence de HSulf-2. Un motif sur la chaîne longue (aa 1-514) en position S484 et un deuxième sur la chaîne courte (aa 515-846) en position S559. Les travaux de thèse d'Ilham Seffouh<sup>96</sup> menés au laboratoire ont suggéré que la sérine impliquée dans la liaison au GAG serait portée par la chaîne courte. Par ailleurs, plusieurs enzymes ont été testées pour tenter de digérer la chaîne de GAG et il s'est avéré que les enzymes de type chondroïtinases (CSase) étaient efficaces. Nos hypothèses de travail sont donc que la sérine impliquée dans la liaison au GAG serait la sérine S559 et que la chaîne pourrait être de nature chondroïtine (Fig 10).<sup>96</sup>



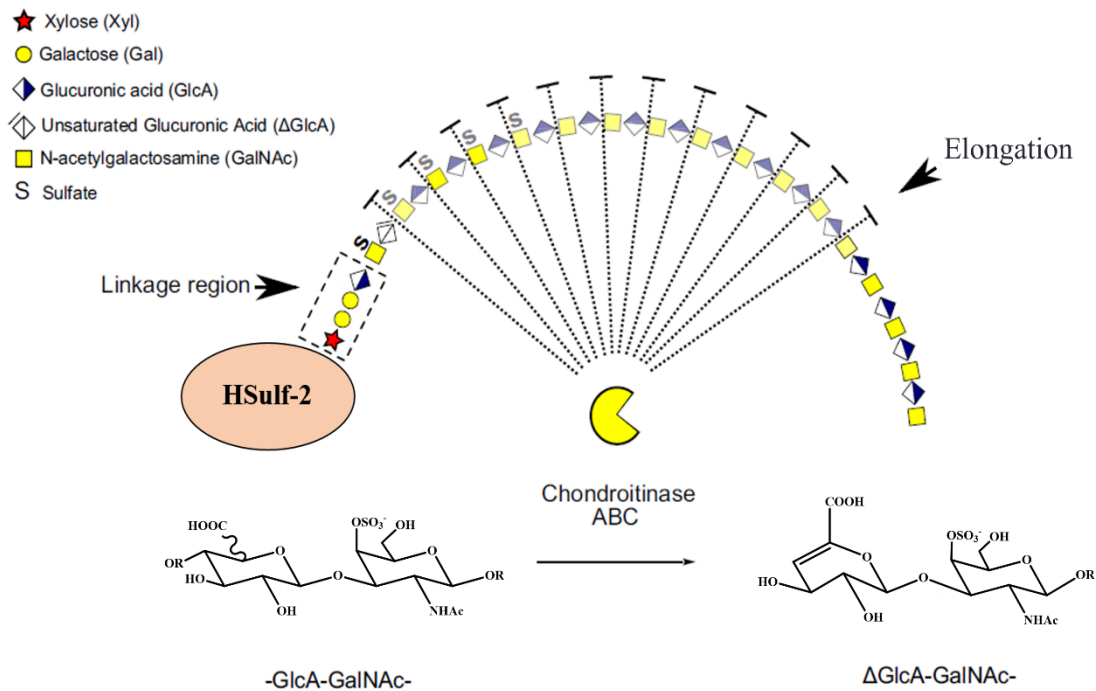
**Figure 10: Mise en évidence du GAG lié à HSulf-2 par SDS-PAGE et digestion enzymatique**

3 µg de HSulf-2 ont été traités ou non par 10 mU de chondroïtinase ABC (CSase ABC) (24 h à 37°C) puis analysés en conditions dénaturantes sur SDS-PAGE 10% (A) HSulf-2 (3 µg) Révélation par une coloration au bleu de Coomassie (B) HSulf-2 (3 µg) Révélation par une coloration au bleu Alcian et nitrate d'argent sans (B1) et avec traitement (B2) par la CSase ABC (d'après la thèse d'Ilham Seffouh)<sup>96</sup> (C) (1) HSulf-2 (2) HSulf-2 traitée par la CSase ABC. La chaîne longue (CL flèche rouge)



On peut observer sur la Fig 10.A, piste 2, la présence d'une seule bande sur le gel coloré au bleu de Coomassie qui correspond à la chaîne longue ici appelée CL. La chaîne courte qui devrait, selon sa séquence peptidique, être détectée à une masse moléculaire inférieure n'est pas visualisée sur le gel. En revanche, lorsque l'on utilise une coloration spécifique des polyanions (bleu Alcian, nitrate d'argent) on détecte une bande à une haute masse moléculaire apparente sur le gel Fig 10.B, piste 1 à environ 100 kDa. Nous avons émis l'hypothèse que cette bande correspond à la chaîne courte porteuse de la chaîne de glycosaminoglycane : ce GAG induirait une masse apparente bien plus élevée que celle attendue pour la chaîne courte, calculée à 38 kDa d'après sa séquence peptidique, et empêcherait la coloration protéique par le bleu de Coomassie. Cette hypothèse est confirmée par la digestion de la protéine par une glycosidase de type chondroïtinase ABC Fig 10.C, piste 2, qui fait apparaître une bande à une masse moléculaire apparente d'environ 50 kDa sur le gel qui serait donc la chaîne courte de 38 kDa portant des modifications post-traductionnelles tel que les *N*-glycosylations.

La chondroïtine (CS) et donc le linker tétrasaccharide devraient bien se trouver sur la chaîne courte. Il faut noter que des modifications de type sulfatation ou phosphorylation peuvent avoir lieu sur ce tétrasaccharide.<sup>113</sup> La présence de ce linker tétrasaccharidique sur HSulf-2 a été recherchée par l'analyse des glycopeptides formés par protéolyse de HSulf-2 par la trypsine et digestion de CS par la chondroïtinase ABC (CSase ABC). Dans le but de déterminer la structure de ce linker nous avons réalisé une analyse nanoLC-ESI-MS/MS de ces glycopeptides. La Figure 11 présente le schéma de digestion de la chondroïtine par la chondroïtinase ABC, avec le linker suivi du disaccharide spécifique des chondroïtines GalNAc- $\Delta$ GlcA.

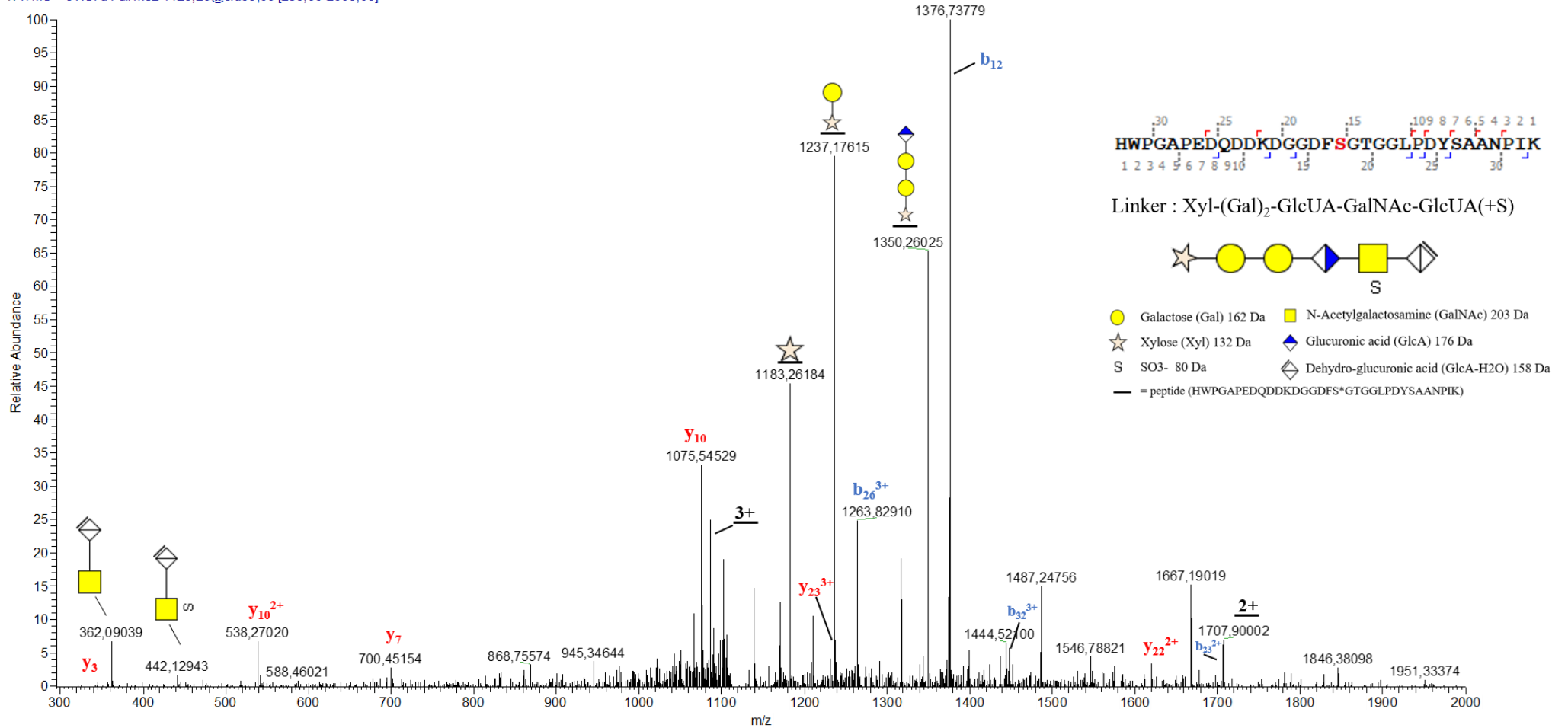


**Figure 11 : Schéma de la chaîne de CS reliée à HSulf-2 par un linker et de sa digestion par la chondroïtinase ABC**

L'enzyme libère le linker lié à un disaccharide insaturé. Le reste de la chaîne, appelé élongation, est digéré sous forme de dp2. (Adapté de A.Gomez Toledo, 2015)<sup>29</sup>

Un glycopeptide comprenant le motif SG a été identifié par nanoLC-ESI-MS/MS (Fig 12) par l'intermédiaire de l'ion fragment diagnostique oxonium HexA-HexNAc à  $m/z$  362,1 correspondant à la structure  $[\text{GlcA-GalNAc-H}_2\text{O+H}]^+$  présente sur le linker. Il est important de souligner que le même type d'ion oxonium a été détecté avec un groupement sulfate à  $m/z$  442,1 correspondant à la structure  $[\text{GlcA-GalNAc-H}_2\text{O+SO}_3\text{+H}]^+$ . Ces ions correspondent aux deux résidus de l'extrémité du linker, ce dernier pouvant donc être monosulfaté. On ne peut pas exclure que l'ion à  $m/z$  362,1 serait issu de l'ion à 442,1  $m/z$  qui aurait perdu un sulfate lors de la fragmentation (Fig 12). Une deuxième hypothèse serait que les deux formes coexistent.

Le peptide SG identifié sur le spectre Fig 12 avec ces ions diagnostiques a pour séquence R.HWPGAPEDQDDKDGGDFS\*GTGGLPDYSAANPIK.V et appartient à la chaîne courte. Ce peptide présente un incrément de masse de 1073,24 sur la sérine S559 du motif SG. Cet incrément de 1073 correspond à la masse d'un linker monosulfaté hexasaccharidique de structure : Xyl-(Gal)<sub>2</sub>-GlcA-GalNAc-ΔGlcA(+S).



**Figure 12 : Identification par Nano-LC-ESI-MS/MS du tétrasaccharide linker de HSulf-2**

3 µg de HSulf-2 sont digérés par la trypsine, après digestion par la CSase ABC 24 h à 37°C. 6 pmole de l'échantillon ont été injectées en nanoLC-ESI-MS/MS en mode positif sur une nano-colonne C18, et analysé par CID à 35%. Ce spectre a été obtenu à partir de l'extraction de l'ion diagnostique *m/z* 362 (Pour plus de détails, voir Matériels et méthodes).

Le spectre Figure 12 montre les ions non seulement diagnostiques de la présence du linker mais également renseignant sur la structure du linker. L'ion à  $m/z$  1183.26 correspond au peptide comportant uniquement un xylose. L'ion à  $m/z$  1237.17 montre l'enchaînement Xyl-Gal et celui à  $m/z$  1350.26 correspond à la structure complète du tetrasaccharide qui est - Xyl-(Gal)<sub>2</sub>-GlcA.

De plus, nous pouvons observer la fragmentation du squelette peptidique ayant conservé le linker avec des ions de série b et y. Ces ions nous permettent d'identifier la séquence peptidique étudiée. Les ions  $b_{23}^{2+}$  et  $y_{22}^{2+}$  confirment la position du linker sur la partie de la séquence  $y_{22}^{2+}[KDG GDFSGTGGL]_{b_{23}}$  soit sur la sérine S559.

La structure déterminée pour le linker est Xyl-(Gal)<sub>2</sub>-GlcA-GalNAc(S)- $\Delta$ GlcA, qui représente le linker tetrasaccharidique Xyl-(Gal)<sub>2</sub>-GlcA avec un disaccharide de chondroïtine insaturé GalNAc- $\Delta$ GlcA. Ce disaccharide provient de la digestion de la chaîne de chondroïtine par la chondroïtinase ABC qui laisse par défaut un disaccharide qu'elle ne peut couper (Fig 11).

La digestion par la chondroïtinase ABC et la présence d'un disaccharide terminal HexNAc-Hex, sulfaté ou non, comme ion diagnostique renforce l'hypothèse d'une chaîne de chondroïtine.

Si l'on observe l'abondance relative du peptide « SG » de la chaîne courte portant le linker on peut observer que ce dernier est présent sous trois formes (Tableau 4). La première est celle présentée jusqu'à maintenant, le peptide comportant le linker sulfaté de masse 1073,2377. La seconde est ce même peptide mais avec une perte du sulfate. Cependant, on détecte également le peptide portant le motif SG sans linker attaché. Ce qui indique que 100% de la population d'HSulf-2 n'est pas gagosylée dans l'échantillon. Ces trois formes sont détectées sur 4 peptides générés par la trypsine (Tableau 4). L'abondance relative de ces trois

formes est calculée par extraction d'ion à partir des chromatogramme (XIC= eXtract Ion Chromatogram). Elle est appelée XIC Ratio et est calculée par la formule suivante :

$$\text{XIC Ratio} = \frac{\text{Peptide Modifié}}{\text{Peptide Modifié} + \text{Peptide non Modifié}}$$

**Tableau 4 : Liste des peptides détectés contenant la Sérine S559 modifiée ou non**

C<sub>37</sub>H<sub>55</sub>NO<sub>30</sub> : Xyl-(Gal)<sub>2</sub>-GlcA-GalNAc-ΔGlcA  
 C<sub>37</sub>H<sub>55</sub>NO<sub>33</sub>S : Xyl-(Gal)<sub>2</sub>-GlcA-GalNAc(S)-ΔGlcA  
 (S) correspond à un groupement sulfate

| Séquence  | Modification/ΔM  | (M+H) mesuré | (M+H) calculé | RT (min) | Abondance relative (%) |
|---|--|--------------|---------------|----------|------------------------|
| <b>HWPGAPEDQDDKDGGDFS*GTGG</b><br>LPDYSAANPIK     | Aucune   | 3414,51      | 3414,51       | 22,78    | 43                     |
|   | C <sub>37</sub> H <sub>55</sub> NO <sub>30</sub> / 993.28    | 4407,79      | 4407,79       | 22,90    | 48                     |
|   | C <sub>37</sub> H <sub>55</sub> NO <sub>33</sub> S / 1073.24 | 4487,75      | 4487,75       | 24,28    | 9                      |
| <b>HWPGAPEDQDDKDGGDFS*GTGG</b><br>LPDYSAANPIKVTHR | C <sub>37</sub> H <sub>55</sub> NO <sub>30</sub> / 993.28    | 4981,03      | 4981,02       | 22,30    | 55                     |
|   | C <sub>37</sub> H <sub>55</sub> NO <sub>33</sub> S / 1073.24 | 4901,08      | 4901,07       | 21,50    | 45                     |
| <b>RHWPGAPEDQDDKDGGDFS*GTGG</b><br>LPDYSAANPIK    | Aucune   | 3570,61      | 3570,61       | 21,05    | 26                     |
|   | C <sub>37</sub> H <sub>55</sub> NO <sub>30</sub> / 993.28    | 4563,89      | 4563,89       | 21,45    | 40                     |
|   | C <sub>37</sub> H <sub>55</sub> NO <sub>33</sub> S / 1073.24 | 4643,86      | 4643,85       | 22,58    | 34                     |
| GGDFS*GTGGLPDYSAANPIK                             | Aucune   | 1923,92      | 1923,92       | 23,68    | /                      |

On peut observer dans le tableau 4 quatre peptides contenant la serine S559. Si l'on somme les abondances relatives pour chaque peptide, le peptide HWPGAPEDQDDKDGGDFS\*GTGGLPDYSAANPIK porte un GAG 57% du temps lorsqu'il est détecté, le peptide HWPGAPEDQDDKDGGDFS\*GTGGLPDYSAANPIKVTHR est tout le temps gagsylé tandis que le peptide RHWPGAPEDQDDKDGGDFS\*GTGGLPDYSAANPIK l'est à 74%. Enfin le peptide

GGDFS\*GTGGLPDYSAANPIK n'a pas été détecté portant un GAG. Ce résultat est la première preuve de la liaison d'une chaîne de GAG sur HSulf-2 *via* un linker tétrasaccharide constitutif de tous les protéoglycanes de type chondroïtine et héparine/héparane sulfate.<sup>114</sup> Ce linker est localisé uniquement sur la sérine S559. Par ailleurs, la sulfatation et la présence d'une unité disaccharidique de type GalNAc-GlcA sont les preuves d'une élévation de ce linker par un polysaccharide de type chondroïtine.<sup>113</sup>

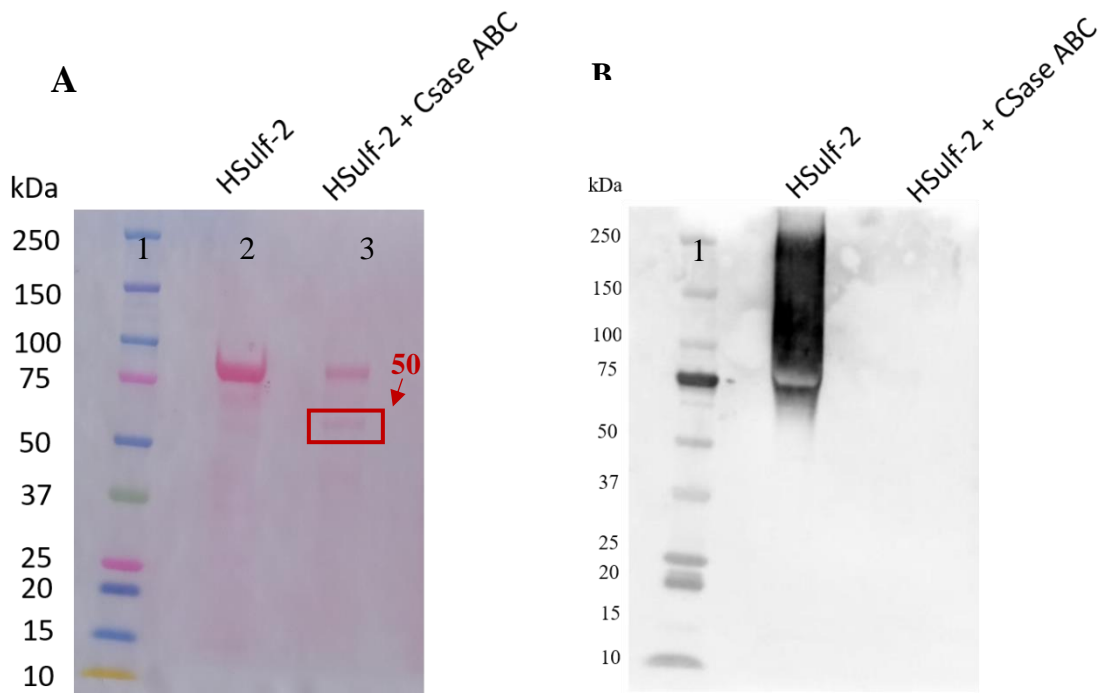
## 7.2 Identification du type de glycosaminoglycane

La présence et la nature CS/DS du GAG lié à HSulf-2 ont été confirmées par une analyse Western Blot en utilisant un anticorps monoclonal anti-chondroïtine appelé CS-56. En effet, sur SDS-PAGE coloré par le bleu de Coomassie, on observe uniquement la chaîne longue<sup>1</sup> à 90 kDa car cette coloration est adaptée aux protéines et non à celles porteuses de chaînes polyanioniques comme la chaîne courte. Le même résultat est obtenu avec une coloration par

---

<sup>1</sup> Sur la Figure 13 la masse moléculaire apparente de la chaîne longue est légèrement plus élevée que pour la figure 10 car ici HSulf-2 est issue d'un lot de production différent comprenant une séquence SNAP d'environ 20 kDa

le rouge Ponceau sur une membrane de nitrocellulose après transfert du SDS-PAGE (Fig 13 A).



**Figure 13 : Analyse par Western Blot de HSulf-2 révélé par un anticorps anti-chondroïtine sulfate.**

(A) Détection par rouge ponceau de HSulf-2 avant (piste 2) et après (piste 3) action de la chondroïtinase ABC (B) Immunodétection de HSulf-2 par l'anticorps anti-chondroïtine CS-56 avant et après action de la chondroïtinase ABC. Piste 1 : marqueurs de poids moléculaire.

L'immuno détection ne met plus en évidence une bande à 90 kDa, mais une bande très intense et diffuse à une masse entre 75 et 250 kDa (Fig 13 B piste 2). Cette bande était totalement invisible sur gel avec une coloration adaptée aux protéines. Elle apparaît uniquement par immuno-détection et correspond donc à une espèce porteuse de GAG CS que nous postulons être la chaîne courte de HSulf-2 avec une chondroïtine sulfate. La digestion de HSulf-2 par la chondroïtinase ABC met en évidence sur la piste 2 de la Fig 13.A comme sur la Fig 10.C, la présence d'une seconde bande vers 50 kDa qui correspondrait à la chaîne légère de HSulf-2 sans GAG, en accord avec le fait que le GAG inhibe la coloration adaptée aux protéines. De



plus par immuno-détection nous n'observons plus la bande à 75-250 kDa pour HSulf-2 traitée par la CSase ABC (Fig 13 B, piste 3).

La chaîne courte dénuée de toute modification possède une masse théorique de 38,83 kDa d'après sa séquence protéique. L'augmentation de sa masse moléculaire apparente par rapport à sa masse moléculaire théorique est donc due à la présence de cette chaîne de chondroïtine sulfate. Ce GAG associé à la chaîne courte de HSulf-2 représente une contribution majeure d'environ 24,7 kDa entre la protéine nue et la protéine native analysée par MALDI-TOF.<sup>96</sup>

Malgré cette avancée majeure dans la caractérisation du GAG présent sur HSulf-2, il faut rappeler que la chondroïtinase ABC n'est pas spécifique d'un substrat donné car elle est capable de digérer les trois types de chondroïtines (A, B et C). De plus, l'anticorps utilisé, le CS-56 se fixe aux chondroïtines A et C. Nous avons donc une confirmation de la nature chondroïtine du GAG mais pas d'informations précises sur sa composition. Notre approche pour la suite a donc été de préciser la composition de cette chondroïtine liée à HSulf-2.

### 7.3 Digestion de la chondroïtine par la hyaluronidase-4

L'analyse des chaînes de chondroïtine est majoritairement réalisée à l'aide d'enzymes de type chondroïtinase dans la littérature.<sup>110,115</sup> Ces chondroïtinases sont des lyases (EC 4.2.2.20), ce qui signifie qu'elles introduisent du fait de leur mécanisme d'action une insaturation du côté non réducteur de la chaîne de chondroïtine.<sup>110</sup> Cette insaturation est d'ailleurs observée sur le linker hexa-saccharidique, vraisemblablement sur l'acide uronique terminal, créant ainsi un acide déhydro-glucuronique (Fig 11). Les avantages des chondroïtinases sont qu'elles sont très efficaces, elles réduisent le polysaccharide en dp2 en quelques heures voire minutes. Leurs inconvénients sont qu'il est difficile d'obtenir des

fragments de taille variée et que l'introduction de cette insaturation fait perdre de l'information du point de vue structural.<sup>110,116</sup>

En effet, l'introduction d'une insaturation sur l'acide uronique fait perdre une information sur la stéréoisométrie du carbone portant la fonction acide. Cette stéréochimie est pourtant capitale pour distinguer les différents types de chondroïtines. Les CS-A et CS-C peuvent être aisément différenciées par la position de leur sulfatation, à savoir en position 4 et 6 respectivement. Les CS-A et CS-B (ou DS pour dermatane sulfate), ne diffèrent que par l'épimérisation de leur fonction acide sur le résidu uronique donnant ainsi deux structures possibles, acide glucuronique ou acide iduronique. Or, l'introduction d'une insaturation empêche la distinction entre les deux épimères GlcA ou IdoA.

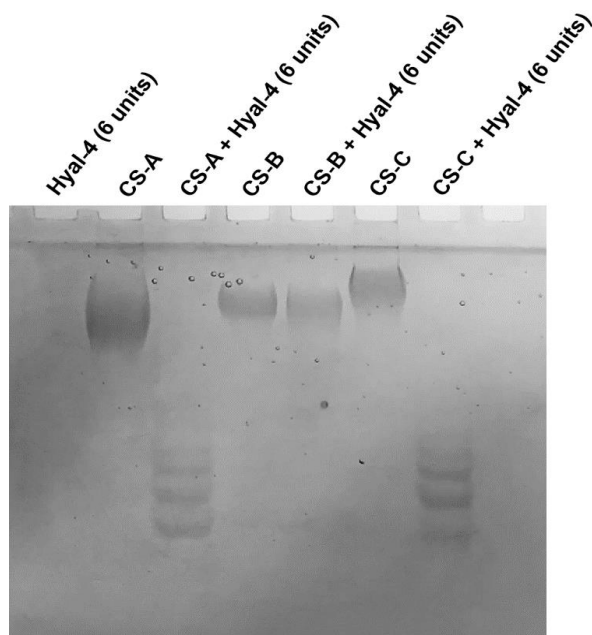
Il nous fallait donc trouver une hydrolase qui n'introduise pas d'insaturation lors de l'hydrolyse. À ce jour, aucune hydrolase dégradant spécifiquement CS / DS n'a été identifiée chez l'homme. En revanche les hyaluronidases (HAases) (EC 3.2.1.35) dégradant l'acide hyaluronique sont également capables de dégrader certaines chondroïtines.<sup>117</sup> Parmi les six HAases humaines, trois sont actives sur CS : HYAL-1, PH20 et HYAL-4. Ces enzymes sont des endo- $\beta$ -N-acetylhexosaminidases catalysant l'hydrolyse des liaisons (1-4) entre les résidus N-acétyl- $\beta$ -D-glucosamine et D-glucuronate dans l'acide hyaluronique.<sup>110</sup> Parmi ces trois enzymes la HYAL-4 est la seule endo-hydrolase capable de dégrader les chondroïtines sulfates.<sup>118</sup> De plus, elle peut former des oligosaccharides de tailles supérieurs aux dp2.<sup>117</sup>

Afin de vérifier si la HYAL-4 est active sur le GAG de HSulf-2 nous avons d'abord mis au point les conditions d'utilisation de l'enzyme sur différents standards de chaîne CS.

### 7.3.1 Mise au point de la dépolymérisation des CS par HYAL-4 analysée par C-PAGE

L'activité de dépolymérisation de HYAL-4 sur CS (CS-A et CS-C) et CS-B a été évaluée dans un premier temps par C-PAGE. Les profils électrophorétiques des milieux de digestion de CS-A et de CS-C montrent la disparition des bandes correspondant à ces polysaccharides, indiquant la dépolymérisation complète de ces substrats. Plusieurs bandes avec des profils semblables pour CS-A et CS-C sont détectées à des masses moléculaires inférieures (Fig 14). Elles correspondent aux oligosaccharides issus de la dépolymérisation. Ce gel montre donc qu'il est possible de produire des oligosaccharides de tailles variées avec la HYAL-4 à partir de CS-A et C.

En revanche, CS-B traité par HYAL-4 n'a montré ni modification de la teneur en polysaccharide ni formation de produits oligosaccharides, traduisant l'absence d'activité de HYAL-4 sur le CS-B. Ce résultat est en accord avec les données de la littérature.<sup>117</sup>

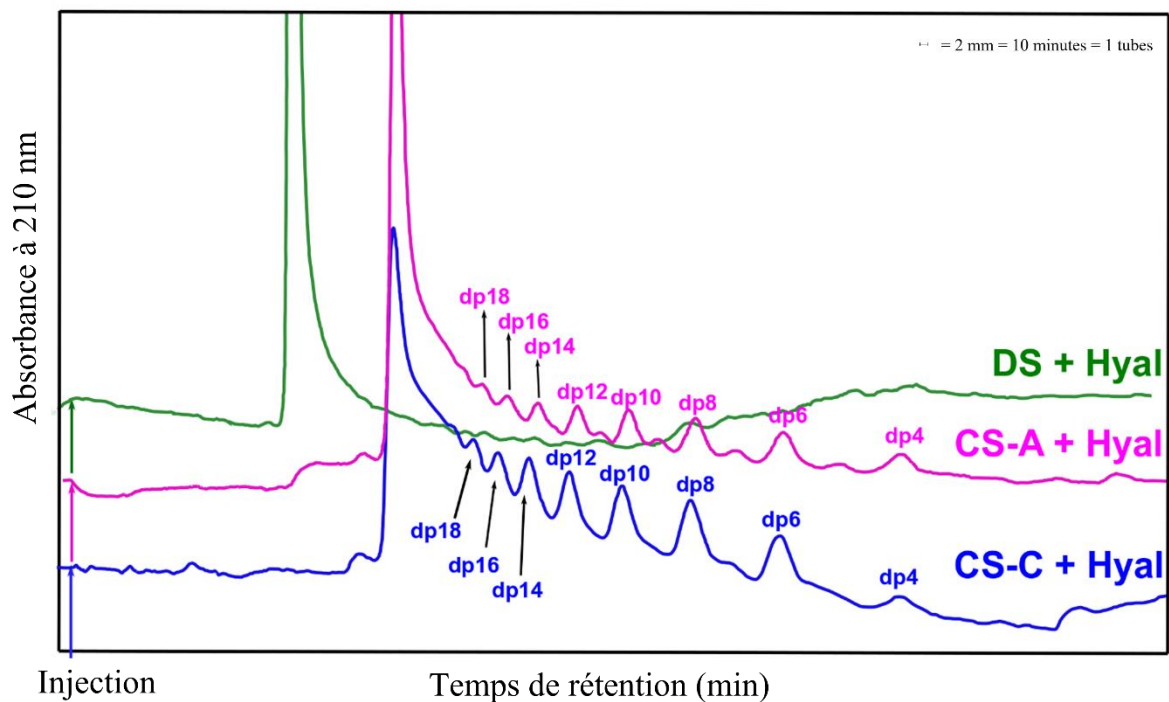


**Figure 14 : Profil C-PAGE de polysaccharides CS-A, CS-B et CS-C et de leur digestion par la HYAL-4.**

Profil C-PAGE des CS-A, CS-B et CS-C intacts et leurs digests correspondants. La digestion a été réalisée par incubation de 6 µg de chaque polysaccharide avec 6 µL de 1000 u/mL HYAL-4 à 37°C pendant la nuit, gel de polyacrylamide à 27 %, double coloration au bleu alcian et au nitrate d'argent.

### 7.3.2 Mise au point de la dépolymérisation des CS par HYAL-4, analysée par exclusion stérique

Les mêmes oligosaccharides ont ensuite été séparés et purifiés par chromatographie d'exclusion stérique (SEC). Les digestions de CS-A et CS-C ont donné des distributions de pics similaires sur les chromatogrammes. Ils ont été attribués à des oligosaccharides allant de di- à octa/deca-saccharides. (Fig 15) En revanche, aucun pic d'oligosaccharide n'a été détecté avec le CS-B, et ce polysaccharide est resté intact comme le montre le pic élué au volume mort de la colonne. (Fig 15)



**Figure 15 : Séparation de polysaccharides de CS-A, CS-C et CS-B (DS) digéré par HYAL-4, obtenue par SEC.**

Chromatogrammes d'exclusion stérique des produits de digestion des polysaccharides CS-A, CS-C et DS. 100  $\mu$ L de mélange de digestion contenant 2,5 mg de sulfate de chondroïtine/dermatan sulfate incubés avec de la HYAL-4 ont été chargés sur une colonne Bio-Gel P-10 et élués dans un éluant NaCl 0,25 M, détection UV à 210 nm.

Dans l'ensemble, ces résultats de l'électrophorèse sur gel et de la chromatographie SEC ont indiqué que les CS-A et CS-C sont de meilleurs substrats que CS-B pour la HYAL-4 humaine. Par ailleurs, on confirme la variété des tailles obtenues, ce qui est un avantage sur la CSase ABC.

### 7.3.3 Analyse par MS des fractions obtenues par SEC

Afin d'en déterminer la structure, trois fractions obtenues par SEC pour les digestions de CS-A et CS-C ont été analysées par ESI-MS en mode négatif pour les dp6-8 et 10 qui devraient être constitués d'unités répétitives (GlcA-GalNAc)<sub>n</sub> (Fig 16).

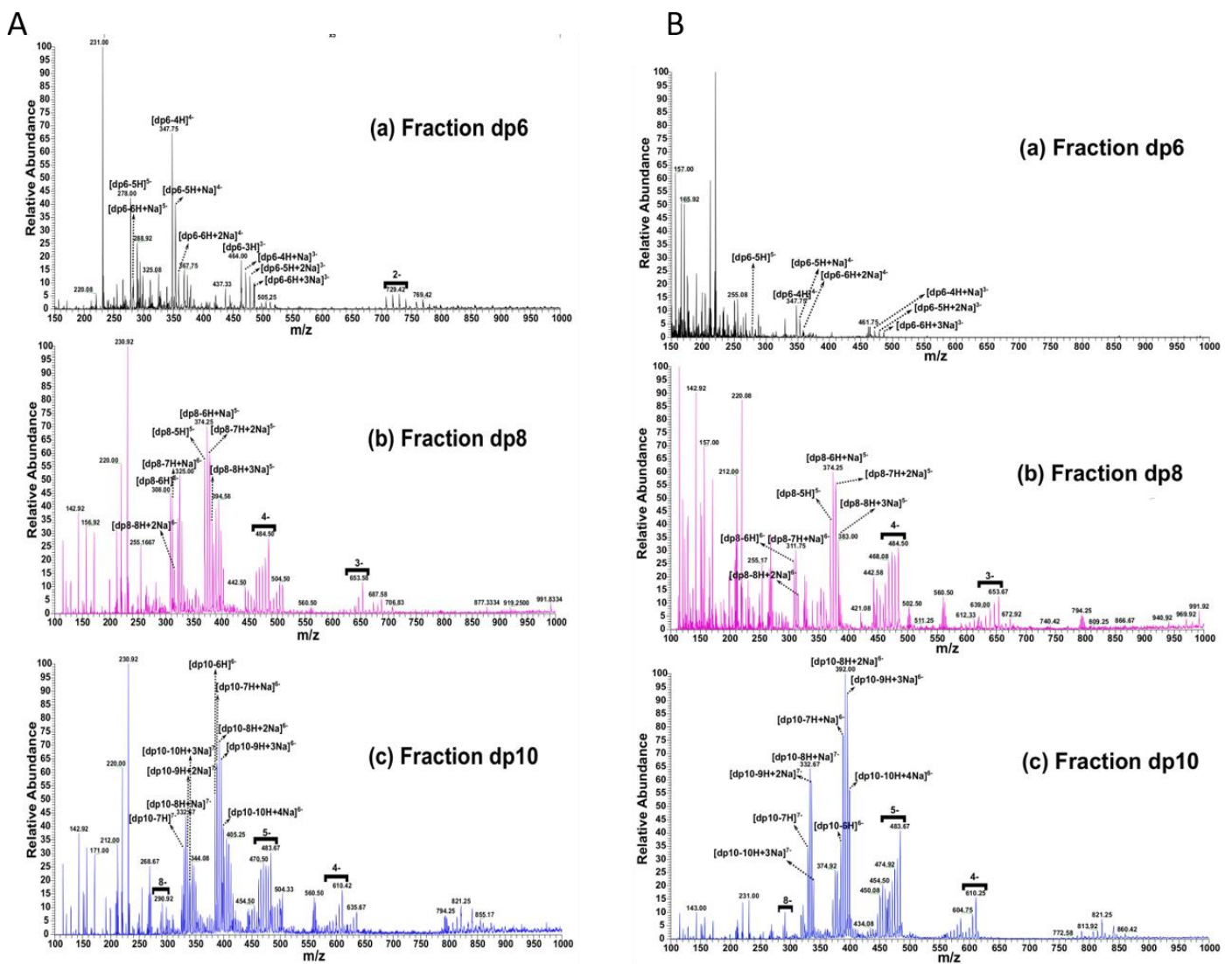


Figure 16 : Spectres ESI-MS LTQ Orbitrap en mode négatif des fractions de digestion par HYL-4 de CS-C (A) et CS-A (B) obtenues à partir de la séparation par chromatographie d'exclusion stérique (SEC).

Infusion directe (3 aL/min) des fractions de SEC diluées dans du méthanol.

Les rapports  $m/z$  des différents oligosaccharides détectés correspondent à des formes saturées, ce qui confirme le mécanisme de type hydrolase de la HYAL-4. Ces résultats ont confirmé la dépolymérisation en oligosaccharides pairs des CS, sulfatés en C4 (CS-A) ou C6 (CS-C).

Les mélanges réactionnels des digestions CS-A/C et CS-B ont également été directement analysés par ESI-MS à haute résolution par nanoLC-ESI-MS/MS LTQ-Orbitrap (Fig 17). Les spectres de masse du digest CS-A (Fig 17.A) ont montré des distributions d'ions principalement attribuées à des oligosaccharides de (GlcA-GalNAcS) allant de dp2 à dp18, c'est-à-dire en accord avec le résultat SEC, mais avec une plage plus large que celle observée par C-PAGE, probablement en raison de la sensibilité plus faible de la détection sur gel. (Tableau A.11-12)

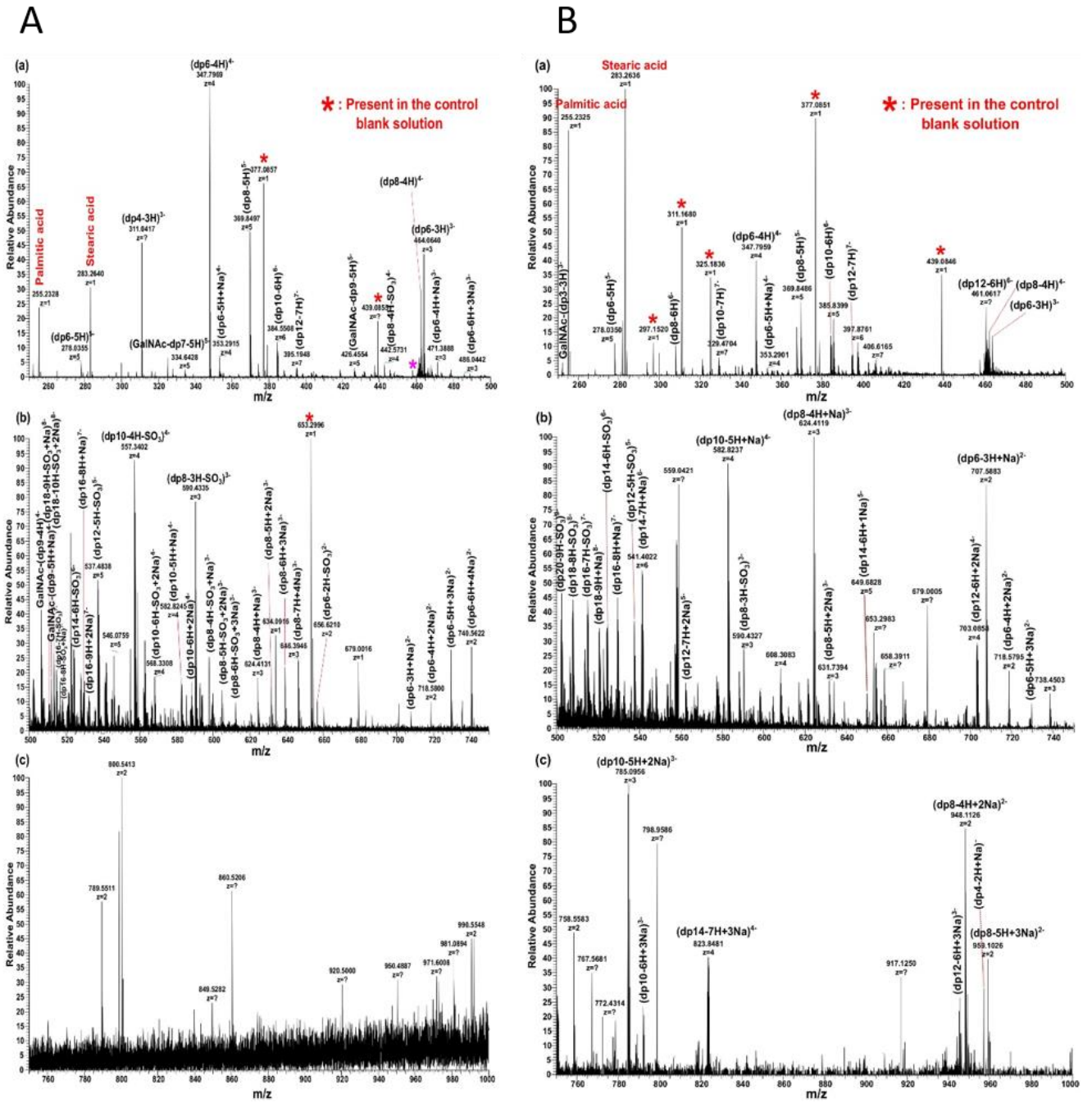


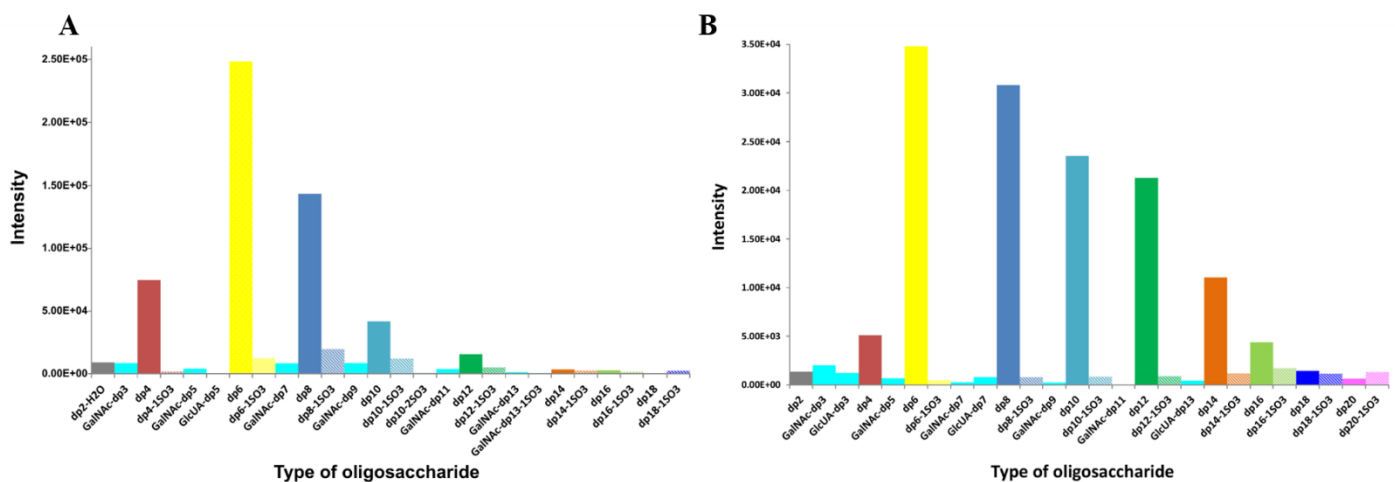
Figure 17 : Spectres de masse LTQ-Orbitrap des digestions CS-A (A) et CS-C (B) en mode ion négatif ESI-MS

De haut en bas : gamme de  $m/z$  200-500, 500-750, 750-1000

La digestion a été réalisée par incubation de 0,2 mg de CS avec 20  $\mu$ L de HYAL-4 (1000 u/mL) à 37°C pendant la nuit. Infusion directe (3  $\mu$ L/min) du mélange de digestion dilué dans du méthanol.



Afin de détailler la formation des différents oligosaccharides CS par HYAL-4, les intensités des ions correspondants ont été reportées en fonction de leur taille, en tenant compte de tous les états de charge pour chaque oligosaccharide (Fig 18). Sur la base de cette quantification du signal, les principaux produits de digestion de CS-A (Fig 18.A) par HYAL-4 sont dp4, dp6, dp8, dp10 et dp12 avec une prévalence marquée de l'hexasaccharide (dp6), qui représente plus de 40% des oligosaccharides détectés. L'abondance relative des différents oligosaccharides n'est pas totalement en accord avec l'intensité des pics correspondants sur le chromatogramme SEC, ce qui est très probablement dû à l'efficacité d'ionisation des différents oligosaccharides lors de l'analyse par spectrométrie de masse. Des oligosaccharides ayant perdu un ou deux sulfates ont également été détectés en petite quantité, leur abondance relative augmentant avec la taille des oligosaccharides. Cette perte de sulfate peut être due soit à certaines séquences sous-sulfatées dans le substrat polysaccharidique, soit à la perte de sulfate lors du processus d'ionisation MS, ou le transport des ions vers l'analyseur.



**Figure 18 : Intensités des différents oligosaccharides observés par l'ESI-Orbitrap**

Intensité absolue cumulée des ions issus de la digestion de CSA (A) et CSC (B), prenant en compte tous les états de charge pour chaque oligosaccharide. Pour chaque ion individuel, seule l'intensité du pic monoisotopique a été comptabilisée. Chaque tiret correspond à une liaison entre les deux nominations, par exemple dp18-ISO<sub>3</sub> correspond à un dp18 plus un SO<sub>3</sub>.

Il convient de mentionner que des oligosaccharides de degré de polymérisation impair saturés (dp3 à dp13) ont également été détectés en plus des oligosaccharides de degrés de

polymérisation pair, mais à une intensité de signal bien plus faible. Ces oligosaccharides « impairs » pourraient résulter soit de la fragmentation dans la source des oligosaccharides pairs soit de l'activité enzymatique. Nous supposons qu'ils résultent de l'activité de la HYAL-4 puisqu'ils sont aussi observés sur le chromatogramme SEC (Fig 15) montrant des épaulements entre les pics de dp pairs.

La formation d'oligosaccharides impairs à partir d'acide hyaluronique par les hyaluronidases de sangsue et de testicules bovins a été reportée récemment .<sup>119</sup> Contrairement aux oligosaccharides pairs, leurs extrémités réductrices et non-réductrices sont identiques. On observe soit un résidu GlcA, soit un résidu GalNAc(4S).

Parmi les oligosaccharides impairs CS-A, ceux avec l'unité GalNAc (4S) aux extrémités réductrices et non-réductrices sont dominants dans les spectres de masse. Le spectre du milieu de digestion de CS-C présente des espèces d'ions comparables à CS-A attribuées à des oligosaccharides à base de (GlcA-GalNAcS) allant de dp2 à dp20. Les principaux oligosaccharides pairs formés sont : dp4, dp6, dp8, dp10, dp12, dp14 et dp16. Cependant, leur distribution en fonction de l'intensité du signal (Fig 18.B) a montré une différence avec CS-A. Bien que le dp6 soit à nouveau l'oligosaccharide formé dominant, l'apport d'oligosaccharides plus longs est significativement plus élevé que lors de la digestion de CS-A.

Il faut de plus souligner que la comparaison directe des intensités absolues de MS des ions pour une digestion de CS-A ou CS-C doit être interprétée avec précaution, car dans chaque milieu de digestion, il existe différents types de molécules à des concentrations variées qui ont une efficacité d'ionisation différente et les ions formés peuvent être sujet au phénomène de suppression de signal. Cependant, les intensités relatives des ions propres à chaque digestion donnent des informations sur l'activité enzymatique de la HYAL-4 pour un polysaccharide donné.

Sur la base des expériences ESI-MS à haute résolution, on peut conclure que CS-A et CS-C sont dépolymérisés par la HYAL-4. La CS-B quant à elle n'est pas clivée par l'enzyme.

Ces résultats nous permettent de confirmer que la HYAL-4 est une enzyme qui peut être exploitée pour la caractérisation de la chondroïtine liée à HSulf-2. Les oligosaccharides saturés formés nous permettront de discriminer les stéréoisomères de chondroïtine. Pour cela, nous nous sommes tournés vers la résonance magnétique nucléaire pour la suite de la caractérisation.

#### 7.4 Caractérisation fine de la composition en chondroïtine de la chaîne de GAG par RMN

Les précédents résultats ont montré que dépolymériser la chaîne de HSulf-2 avec la HYAL-4 est un outil de choix pour créer des oligosaccharides plus longs que ceux créés par les chondroïtinases. De plus, en n'introduisant aucune insaturation sur les acides uroniques, nous pourrions faire une distinction entre les épimères GlcA et IdoA. Ces deux points font de la hyaluronidase une enzyme intéressante à exploiter pour l'analyse par RMN.

L'objectif ici a été d'utiliser la RMN pour discriminer des oligosaccharides de CS et DS grâce à l'information d'épimérisation conservée à l'issue de la dépolymérisation d'HSulf-2 par la HYAL-4. Ces oligosaccharides forment des ions isomères par spectrométrie de masse. D'autres méthodes auraient pu être envisagées, comme la mobilité ionique, mais cela aurait demandé un important travail de développement analytique. Il aurait fallu des standards purs pour nous permettre d'identifier les signaux en mobilité ionique et nous ne disposons pas de quantité d'enzyme suffisante pour ce travail. Nous avons donc opté pour la RMN ou les déplacements chimiques des CS et DS sont des données bien référencées dans la littérature.<sup>120,121</sup>

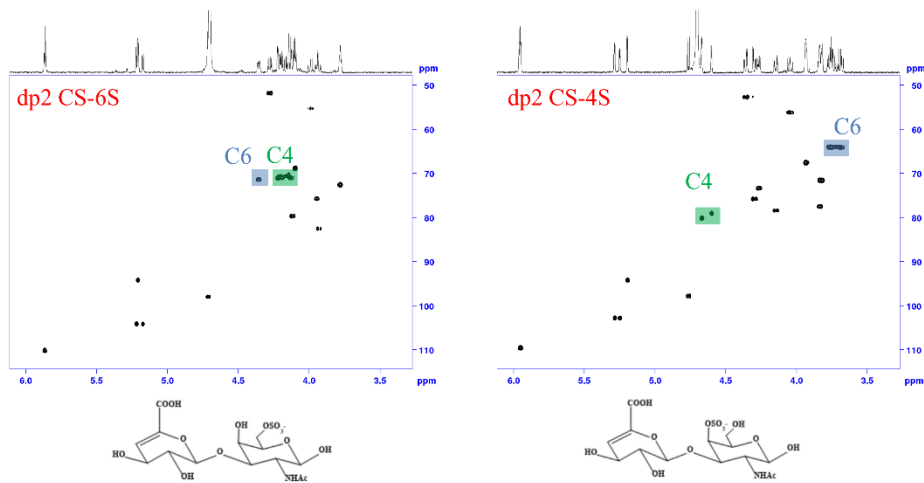
Toutefois, avant d'analyser les échantillons de HSulf-2, des analyses RMN ont été réalisées sur des di- et tétrasaccharides standards commerciaux. Les oligosaccharides de CS-A, CS-B (DS) et CS-C commerciaux ne sont fournis que sous forme d'extrémité non réductrice insaturée. L'objectif des expériences suivantes a été d'examiner les différences de déplacements chimiques en fonction de la position du sulfate sur le résidu GalNAc et la présence de résidus IdoA ou GlcA.

#### 7.4.1 Mise au point de l'analyse de chondroïtine par RMN

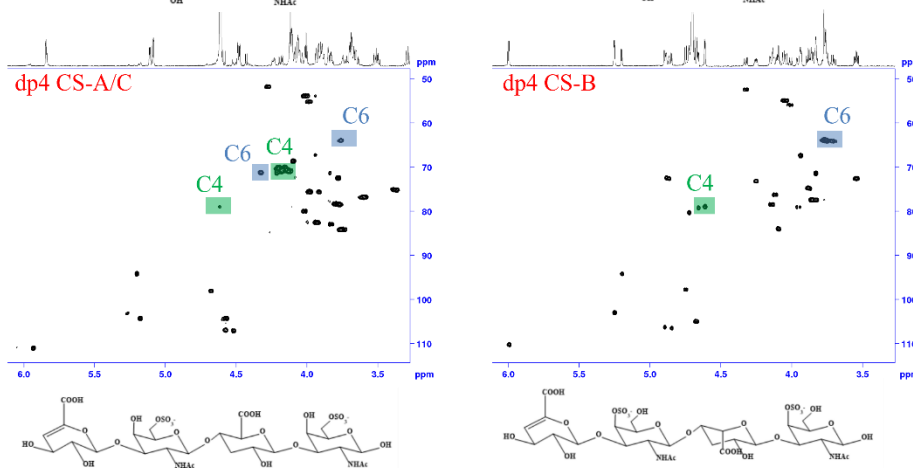
L'analyse des spectres HSQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  des disaccharides commerciaux a montré que les protons et le carbone en positions 4 et 6 présentent des déplacements chimiques caractéristiques en fonction de la position de sulfatation, ce qui nous permet de distinguer CS-A et CS-B de CS-C (Fig 20 A).

<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC

A



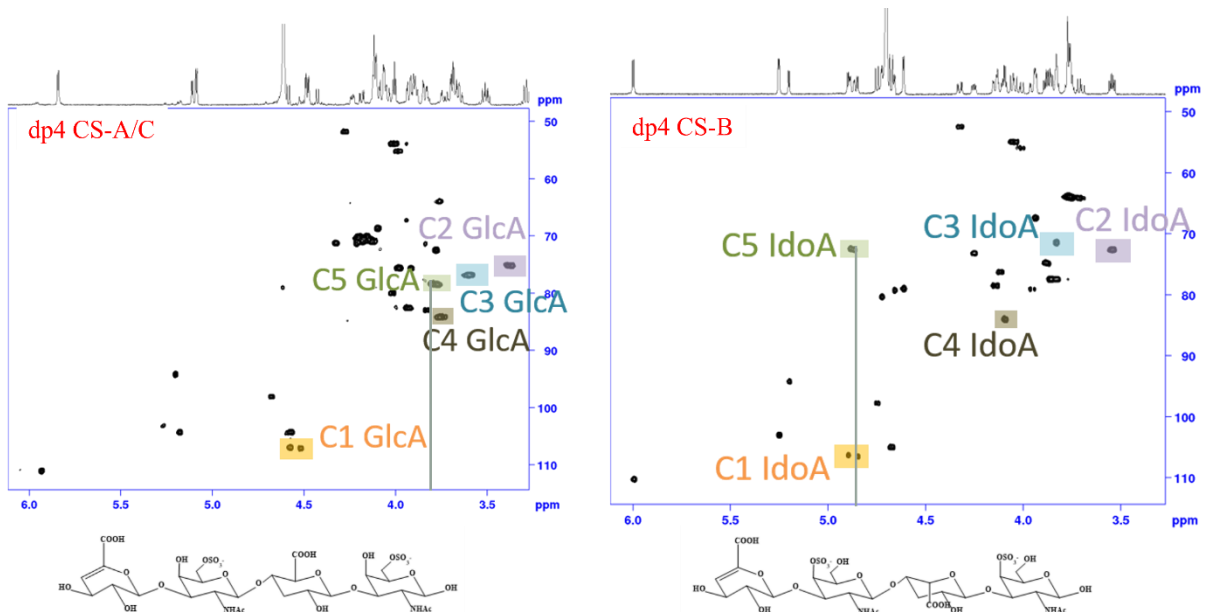
B



**Figure 19 : Spectre <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC de standards commerciaux (A) de disaccharides insaturés CS-4S (CS-A) et CS-6S (CS-C) et de tétrasaccharides insaturés dp4 CS A et C et dp4 CS-B**

Oligosaccharides commerciaux (1 mM) analysé en solution dans D<sub>2</sub>O dans des capillaires RMN de 600 aL

En ce qui concerne la discrimination de CS-A et CS-B tous deux sulfatés en position 4 sur les résidus GalNAc, elle repose sur la présence d'isomères due à l'épimérisation de l'acide uronique en position 5. En effet, le groupement carboxylique en position-5 peut avoir deux orientations différentes, se traduisant par des résidus GlcA ou IdoA pour CS-A ou CS-B, respectivement. L'analyse RMN des tétrasaccharides CS-A et CS-B commerciaux a montré que les résidus GlcA et IdoA présentent des déplacements chimiques caractéristiques qui permettent de les discriminer (Fig 21).



**Figure 20 : Spectre  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC à 303K des acides iduronique et glucuronique de standards de tétrasaccharides CS-A/C (4 et 6 S) et CS-B**

Oligosaccharides commerciaux (1 mM) en solution dans  $\text{D}_2\text{O}$  dans des capillaires RMN de 600 aL

Fig. 20, les 5 carbones des acides uroniques présentent un déplacement chimique différent selon l'isomère étudié. Par exemple les protons portés par le carbone C5 ont un déplacement chimique d'environ 4 ppm pour l'isomère GlcA alors qu'ils se trouvent à environ 5 ppm pour l'isomère IdoA.

## 7.4.2 Analyse RMN de la dépolymérisation de HSulf-2 par HYAL-4

Après avoir validé la discrimination des isomères par RMN nous avons entrepris les analyses de HSulf-2. HSulf-2 a été étudiée en utilisant les mêmes expériences RMN que pour les oligosaccharides standards. Toutefois, l'analyse des échantillons de HSulf-2 a posé plusieurs difficultés. En premier lieu, la solution de stockage de HSulf-2 contient 20% de glycérol, composé hautement incompatible avec des mesures par RMN. La présence de glycérol dans l'échantillon sature complètement le signal et cache tous signaux possibles d'oligosaccharide. Nous avons donc traité la préparation de HSulf-2 afin d'éliminer le glycérol.

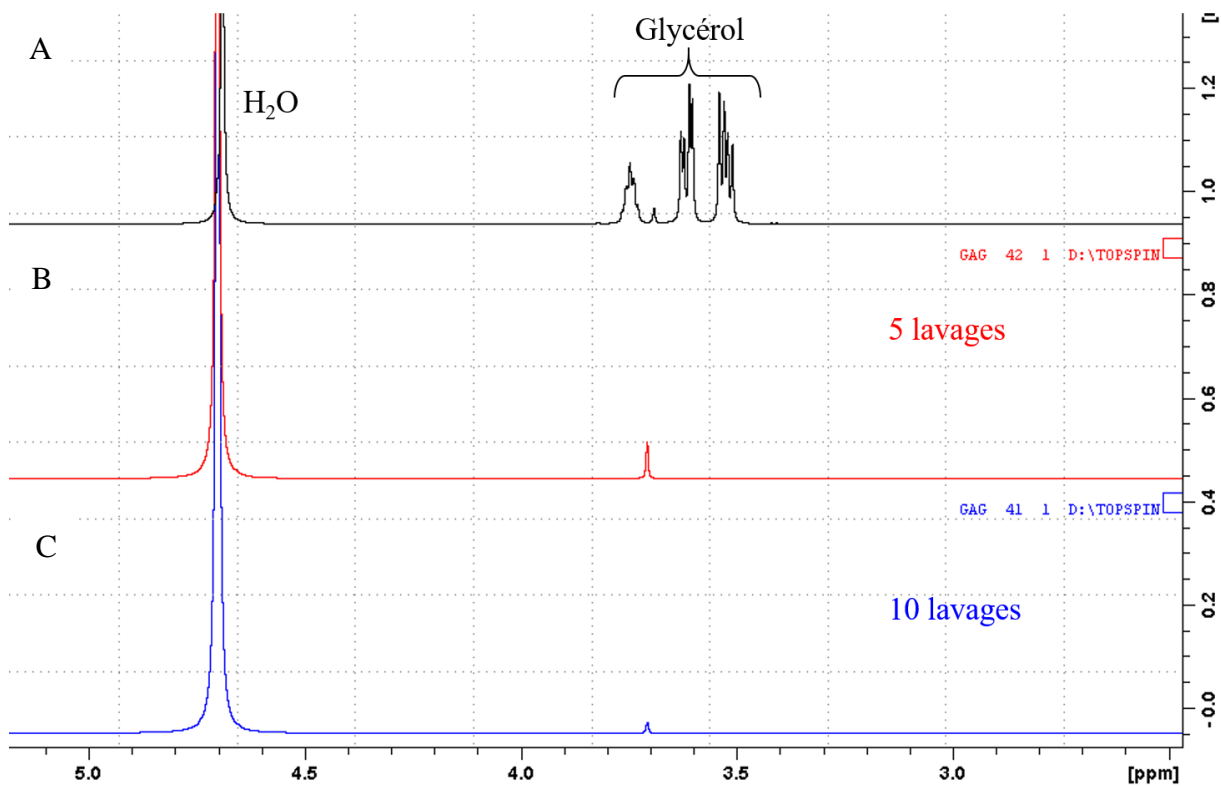


Figure 21 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  de la diminution de la présence de glycérol après 5 et 10 cycles de lavage par centrifugation tangentielle.

Filtration 45 min 15000 g sur filtre Amicon 3K pour chaque cycle.

Pour ce faire, nous avons comparé deux protocoles d'élimination du glycérol (Fig 21). La référence est le spectre RMN  $^1\text{H}$  de l'échantillon non filtré avec 20% de glycérol (Fig 21 A),

le deuxième spectre est celui de l'échantillon ayant subi 5 lavages par filtration tangentielle sur filtre Amicon 3 kDa (Fig 21 B), et enfin le troisième, 10 lavages sur le même type de filtre (Fig 21 C). Le lavage est réalisé dans le tampon de réaction utilisé pour la digestion par la HYAL-4 du GAG porté par HSulf-2.

Comme nous pouvons l'observer sur la Figure 21, après seulement 5 cycles de lavages de l'échantillon, le signal du glycérol est nettement diminué. La différence entre 5 et 10 lavages n'étant pas significativement importante, nous avons décidé d'utiliser un protocole comprenant 5 cycles de lavage pour la suite de nos analyses.

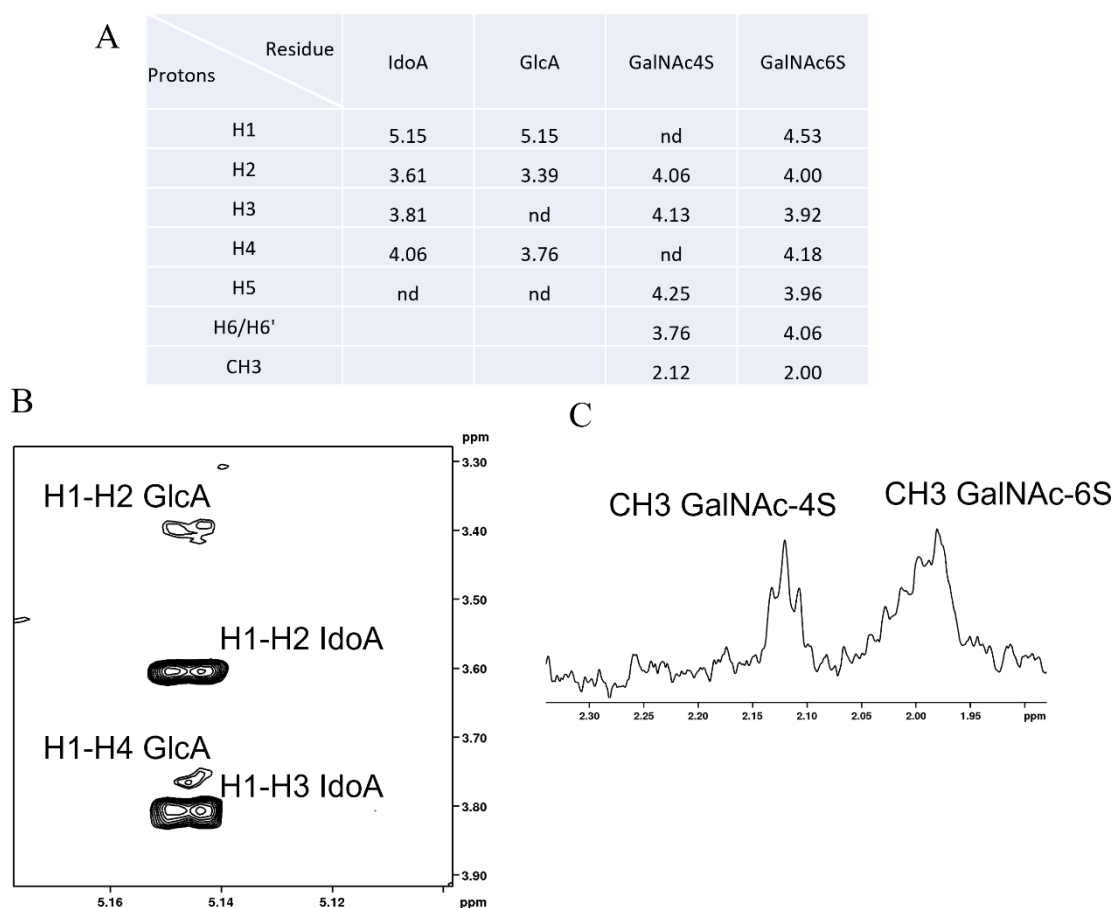
Nos expériences ont été effectuées à 303 K sur un spectromètre RMN Bruker AVIII HD 600 MHz équipé avec une cryosonde à triple résonance. Ce spectromètre RMN a une limite de détection  $^1\text{H}$  d'environ 1  $\mu\text{M}$ , cependant pour analyser un échantillon contenant des grosses molécules comme HSulf-2 et la hyaluronidase, la concentration de la molécule à analyser doit atteindre 200  $\mu\text{M}$ . De ce fait, pour l'échantillon HSulf-2, un élargissement de pic ou « line broadening » important a été observé, empêchant l'obtention des spectres HSQC et HMBC. Cette observation était probablement due à la concentration d'échantillon et à l'interaction des oligosaccharides HSulf-2 avec la HYAL-4 utilisée pour le digérer. En effet en RMN la largeur à mi-hauteur des pics est proportionnelle à  $1/R_2$ ,  $R_2$  étant la vitesse de relaxation transversale.  $R_2$  est d'autant plus petite que la molécule est grosse. On observe donc un « line broadening » quand on étudie de grosses molécules comme des protéines.

Dans ces conditions, nous avons enregistré des spectres 1D, DQF-COSY et TOCSY pour attribuer des protons des résidus osidiques libérés par la digestion du GAG d'HSulf-2 par la HYAL-4. Les déplacements chimiques mettent en évidence la présence de 4 types de résidus : GalNAc4S, GalNAc6S, IdoA et GlcA (Fig 22.A). La présence des deux positions de sulfatation de GalNAc confirme la coexistence de CS-A / B et CS-C dans la chaîne de GAG



(Fig 22.C). De plus, la détection des résidus IdoA et GlcA démontre la présence à la fois de CS-A et CS-B dans le glycosaminoglycane (Fig 22.B). Il est à noter que IdoA est dans une proportion plus élevée que GlcA. On peut ainsi conclure que CS-B est présent dans de plus grandes proportions au sein du GAG. On ne peut toutefois pas exclure que GlcA interagisse plus fortement que IdoA avec la HYAL-4 ce qui causerait une baisse d'intensité du signal de l'acide glucuronique.

Par ces expériences RMN, nous avons donc pu confirmer la présence dans l'échantillon de deux positions de sulfatation 4S et 6S (Fig. 22 A et C) mais également la présence des deux épimères de la fonction carboxylique de l'acide glucuronique, à savoir IdoA et GlcA (Fig 22 A et B), dans la structure de la chondroïtine liée de manière covalente à l'enzyme HSulf-2.



**Figure 22** Analyse RMN des protons des résidus formés par la digestion du GAG de HSulf-2 par la HYAL-4.

(A) Déplacements chimiques expérimentaux des 4 types de résidus : GalNAc4S, GalNAc6S, IdoA et GlcA. (B) Région du spectre TOCSY de HSulf-2 montrant la présence de résidus IdoA et GlcA. (C) Région du spectre 1D  $^1\text{H}$  de HSulf-2 montrant les signaux du groupe méthyle attestant de la présence de résidus GalNAc sulfatés en position 4 et -6.

## 7.5 Conclusion

Ces travaux nous ont permis de détecter et caractériser pour la première fois la structure du bras « linker » saccharidique entre la protéine de HSulf-2 et la chaîne de GAG de type chondroïtine qu'elle porte. Nous avons ainsi déterminé sa position et sa structure. Ce linker tétrasaccharidique a été détecté sous la forme d'un hexa-saccharide de structure Xyl-(Gal)<sub>2</sub>-GlcA-GalNAc(S)-ê *I n e* contenant un disaccharide de chondroïtine mono-sulfaté et insaturé (en italique).

Nous avons par ailleurs pu déterminer que la HYAL-4 est un nouvel outil dans la caractérisation des chaînes de chondroïtine puisque cette enzyme digère CS-A et CS-C en créant des oligosaccharides de tailles variées analysables par spectrométrie de masse, chromatographie SEC et RMN. Pour finir cette enzyme nous a permis d'obtenir des oligosaccharides saturés analysables par RMN. Ces résultats nous ont permis de montrer la présence de CS-B dans la chaîne de chondroïtine de HSulf-2. Il faut également savoir que notre choix s'est tourné vers la HYAL-4 car c'est une hydrolase du milieu extracellulaire, ce qui fait d'elle un partenaire d'interaction possible pour HSulf-2 *in-vivo*.

Si l'on revient aux questions que nous nous posions en début de chapitre, les réponses suivantes ont été obtenues : la modification post-traductionnelle de type chondroïtine de HSulf-2 possède une structure de protéoglycane classique avec un linker. De plus, la structure de ce linker est comparable à celles des protéoglycanes connues dans la littérature.

Dans la suite de ce travail nous chercherons donc à répondre aux questions suivantes ; Pourquoi une chaîne de GAG sur HSulf-2 et non sur HSulf-1 ? Quelles en sont les conséquences structurales et peut-on relier cette MPTs à l'activité de l'enzyme HSulf-2 ?

Cette modification post-traductionnelle octroie une masse moléculaire apparente très importante à la protéine. La chaîne de GAG a été détectée avec une masse de 24 727 Da par spectrométrie de masse MALDI-TOF lors de précédents travaux de notre équipe.<sup>96</sup> Elle ne représente néanmoins pas la totalité des modifications post-traductionnelles de la protéine. La masse totale de HSulf-2 a été mesurée par MALDI-TOF à 133 115 Da. La séquence primaire quant à elle représente 98 170 Da. En sommant la masse de la protéine nue et du GAG, on obtient 122 897 Da. Ainsi, plus de 10 000 Da pourraient provenir de modifications post traductionnelles qu'il reste à élucider. Une modification qui pourrait entraîner un tel incrément

de masse est la *N*-glycosylation. Nous allons donc chercher à identifier les positions et structures des possibles *N*-glycosylations de HSulf-2.

## **Chapitre 3 : Caractérisation protéomique fine de HSulf-2 : Élucidation des N-glycanes et des ponts disulfure**

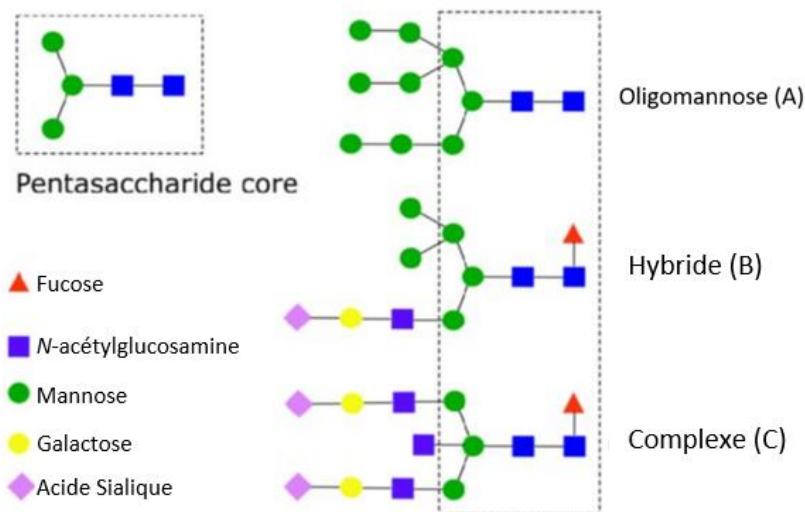
Dans ce travail, nous avons caractérisé d'autres modifications post-traductionnelles de HSulf-2. Ceci devrait nous donner des informations sur son repliement *via* les ponts disulfure qui, *in fine*, nous permettront peut-être de comprendre son activité et son mode de fonctionnement. Par ailleurs, les *N*-glycanes pourraient également jouer un rôle dans l'activité de l'enzyme. En effet chez l'orthologue aviaire, l'activité est dépendante de la présence des *N*-glycanes sur la chaîne protéique de QSulf-1.

Nous nous sommes intéressés dans un premier temps à la localisation et aux structures des *N*-glycanes portées par les deux chaînes de HSulf-2, puis en second lieu aux ponts disulfure entre deux cystéines, indispensables au maintien de la structure tridimensionnelle de la protéine.

## 8.1 N-glycosylation de HSulf-2

La glycosylation joue un rôle majeur dans la reconnaissance, la signalisation cellulaire ainsi que la stabilité des protéines.<sup>122</sup> Plus de 50% des protéines eucaryotes connues à ce jour sont N-glycosylées.<sup>123</sup>

Les N-glycanes sont des oligosaccharides attachés par un lien covalent à un résidu asparagine (Asn). Chez les eucaryotes, tous les N-glycanes sont reliés à Asn par une glucosamine liée en beta à un site consensus Asn-X-Ser/Thr (Ser : sérine, Thr : thréonine, X pouvant être n'importe quel acide aminé).<sup>124</sup> Les N-glycanes sont classés en trois types : oligomannose, complexe ou hybride (Fig 23).<sup>125,126</sup>



**Figure 23 : Types de N-glycanes**<sup>126</sup>

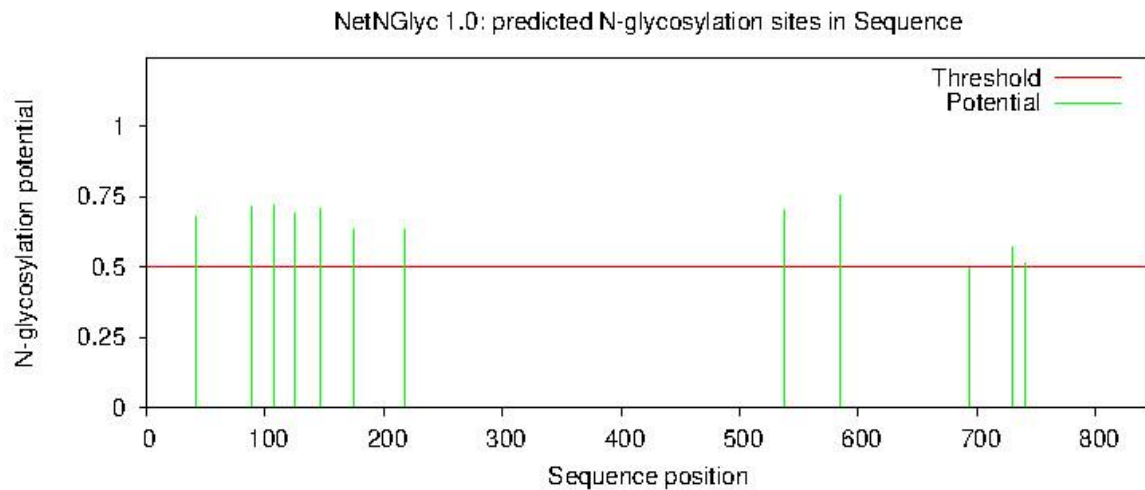
(A) N-glycane Oligomannose: structure ne possédant que des mannoses ; (B) N-glycane Hybride : Structure contenant un résidu N-acétylglucosamine sur une antenne. ; (C) N-glycane Complexe : structure à deux, trois ou quatre antennes avec des résidus N-acétylglucosamine, pouvant comporter des acides sialiques et/ou des fucoses.

Chacun de ces types possède un core commun composé de  $\text{Man}_3\text{-GlcNAc}_2$  (Man : Mannose, GlcNAc : glucosamine). Les peptides N-glycosylés sont identifiables car une partie de ce core, Man-GlcNAc ou Hex-HexNAc, constitue un fragment diagnostique en

spectrométrie de masse en tandem permettant de détecter la présence d'un *N*-glycane sur un peptide fragmenté par CID.<sup>127</sup> C'est donc cette méthode que nous avons utilisée.

### 8.1.1 Identification des positions des *N*-glycanes par LC/MSMS (CID/ETD)

Pour commencer, nous avons confirmé les sites potentiels décrits dans la littérature à l'aide du logiciel NetNGlyc 1.0.<sup>128</sup> L'examen bio-informatique de la séquence a révélé 12 sites potentiels de *N*-glycosylation en accord avec la littérature et avec des probabilités plus ou moins élevées (Fig 24).

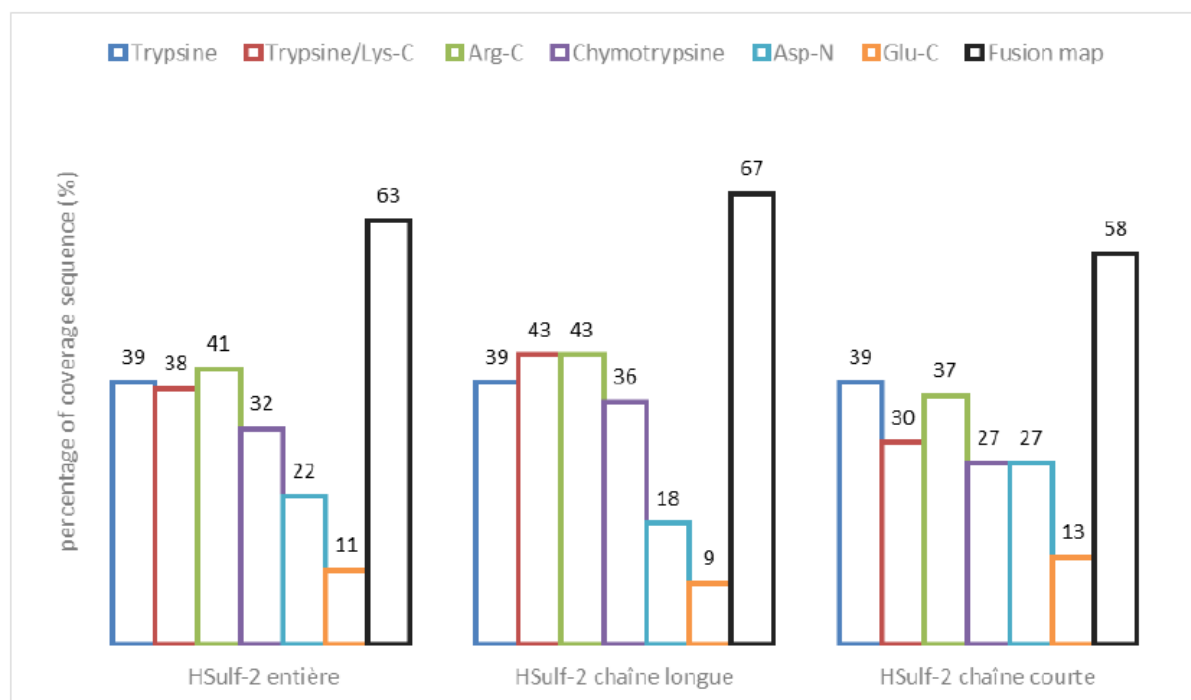


**Figure 24: Prédiction des *N*-glycosylations de HSulf-2 par NetNGlyc 1.0.**

En rouge la valeur de seuil statistique, en vert les sites potentiels de *N*-glycosylation le long de la chaîne de HSulf-2 (cf texte).

Ces sites potentiels permettent d'établir la liste des peptides à analyser par spectrométrie de masse afin d'identifier les *N*-glycanes, ce sont ceux possédant les asparagines : 41, 88, 108, 125, 147, 174, 217, 537, 584, 693, 730, 740. Cependant, l'analyse NanoLC-MS/MS de HSulf-2 a précédemment montré qu'il est difficile d'obtenir une couverture de séquence élevée de la protéine entière.<sup>94</sup> Une digestion par la trypsine suivie d'une analyse NanoLC-MS/MS avec

fragmentation par CID ne produit pas de peptides de longueur appropriée pour la détection de tous les sites potentiels de *N*-glycosylation. L'utilisation de différentes enzymes seules ou en combinaison comme trypsine + Lys-C, Arg-C, chymotrypsine, Asp-N ou Glu-C n'a pas augmenté la couverture de séquence sur ces sites (Fig 25).<sup>94</sup> Ainsi, les asparagines N108, N147, N584 et N740 sont des sites potentiels de *N*-glycosylation non détectés à ce jour.



**Figure 25: Couvertures de séquence protéique de HSulf-2 entière.**<sup>94</sup>

Pourcentages de couverture de séquence obtenus par digestion en solution de HSulf-2 par les protéases: trypsine, le mélange trypsine / Lys-C, Arg-C, chymotrypsine, Asp-N ou Glu-C. La « fusion map » regroupe la couverture de séquence obtenue avec toutes les enzymes.

Nous avons donc entrepris d'analyser les glycopeptides après protéolyse trypsique par nanoLC-MS/MS et soumis aux fragmentations CID et ETD selon une méthode décrite par Meshref<sup>129</sup>, afin de localiser et caractériser les modifications post-traductionnelles de type *N*-glycane. Ainsi, les glycopeptides sont d'abord identifiés par CID, grâce à la formation d'ions oxonium diagnostiques Hex-HexNAc (Man-GlcNAc) à  $m/z$  366.13. La fragmentation par CID donne deux informations : la présence d'un oligosaccharide sur le peptide et sa structure. La



fragmentation par ETD du même glycopeptide, va cibler préférentiellement le squelette peptidique et va permettre de confirmer la séquence peptidique porteuse du *N*-glycane ainsi que sa position. Les interprétations ont été effectuées à l'aide du logiciel Byonic.<sup>130</sup>

En suivant cette stratégie (Fig 26), nous avons identifié cinq sites de *N*-glycosylations, au sein de différents peptides en fonction des clivages ou non par la trypsine. Ces glycopeptides sont présentés dans le tableau 5.

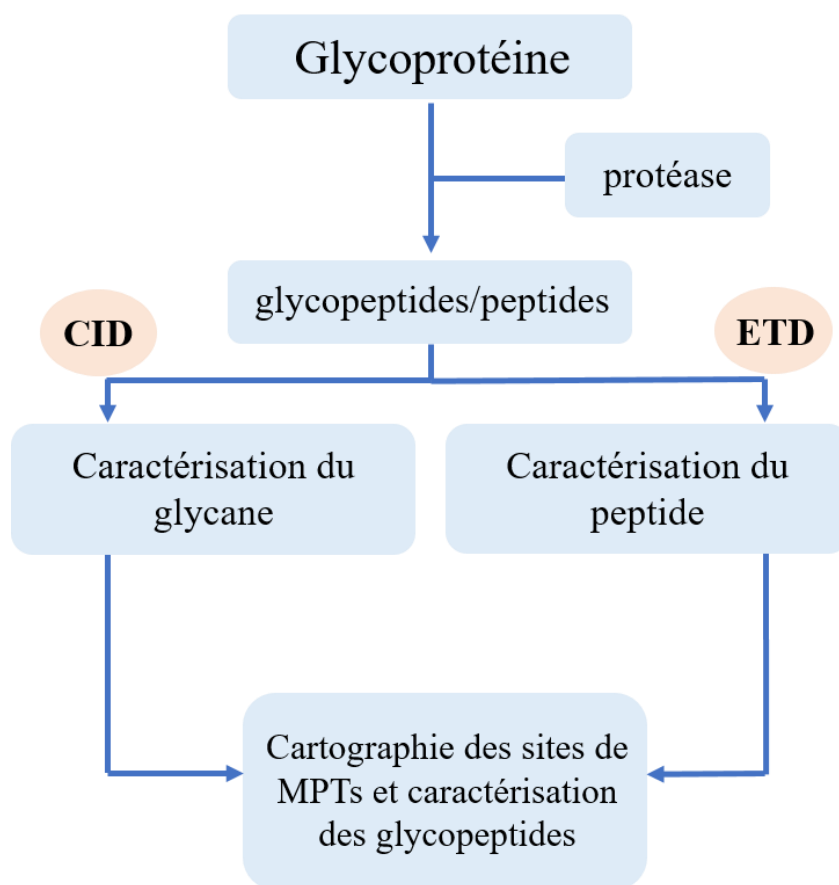


Figure 26 : Stratégie d'identification des glycopeptides (D'après Y.Mechref)<sup>129</sup>

Tableau 5 : Liste des glycopeptides de HSulf-2 détectés par analyse nanoLC-MS/MS (CID/ETD), l'étoile désigne l'asparagine lié au N-glycane.

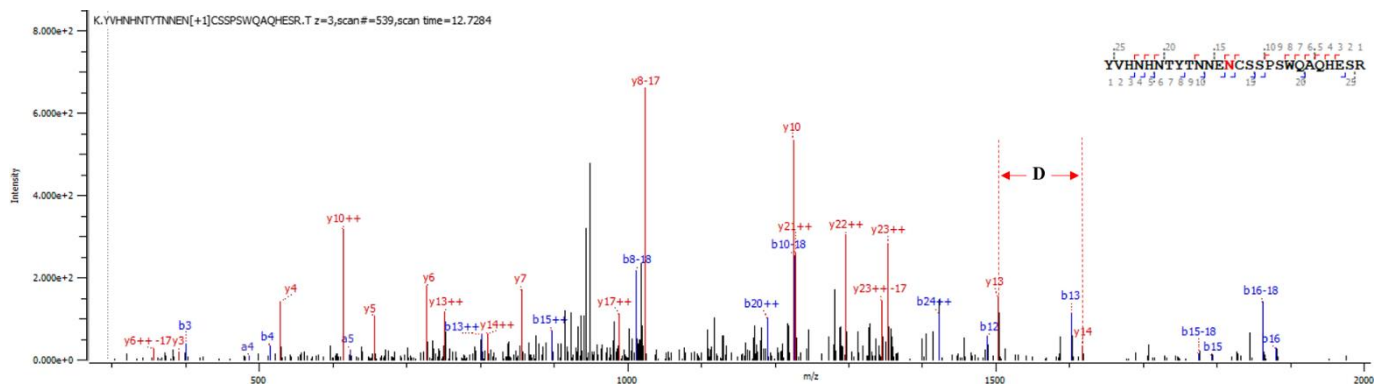
| Numéro de résidu | Séquence du peptide   | Composition                   | (M+H) <sup>+</sup> obs. | (M+H) <sup>+</sup> cal. |
|------------------|---|-------------------------------|-------------------------|-------------------------|
| N88              | <sup>69</sup> SSILTGKYVHNHNTYTNNEN*CSSPSWQAQHEsr <sup>101</sup> | HexNAc(2)Hex(6)               | 5168.18                 | 5168.18                 |
|                  |   | HexNAc(2)Hex(7)               | 5330.24                 | 5330.23                 |
|                  |   | HexNAc(2)Hex(8)               | 5492.28                 | 5492.28                 |
| N88              | <sup>76</sup> YVHNHNTYTNNEN*CSSPSWQAQHEsr <sup>101</sup>        | HexNAc(2)Hex(6)               | 4481.78                 | 4481.78                 |
|                  |   | HexNAc(2)Hex(9)               | 4967.94                 | 4967.94                 |
|                  |   | HexNAc(2)Hex(8)               | 4805.91                 | 4805.89                 |
|                  |   | HexNAc(2)Hex(7)               | 4643.84                 | 4643.83                 |
| N125             | <sup>114</sup> TAFFGKYLNEYn*GSYVPPGWKEWVGLLK <sup>141</sup>     | HexNAc(2)Hex(5)               | 4480.08                 | 4480.07                 |
|                  |   | HexNAc(3)Hex(5)               | 4683.16                 | 4683.15                 |
| N174             | <sup>166</sup> DYLTDLITN*DSVSFFR <sup>181</sup>                 | HexNAc(2)Hex(5)               | 3122.33                 | 3122.34                 |
|                  |   | HexNAc(2)Hex(4)               | 2960.30                 | 2960.29                 |
| N174             | <sup>157</sup> EKHGSDYSKDYLTLITN*DSVSFFR <sup>181</sup>         | HexNAc(2)Hex(5)               | 4153.81                 | 4153.81                 |
| N174             | <sup>159</sup> HGSDYSKDYLTLITN*DSVSFFR <sup>181</sup>           | HexNAc(2)Hex(7)               | 4220.78                 | 4220.78                 |
|                  |   | HexNAc(4)Hex(5)               | 4302.84                 | 4302.83                 |
|                  |   | HexNAc(2)Hex(6)               | 4058.73                 | 4058.72                 |
|                  |   | HexNAc(2)Hex(5)               | 3896.68                 | 3896.67                 |
| N217             | <sup>214</sup> LFPN*ASQHITPSYNYAPNPKHWIMR <sup>239</sup>        | HexNAc(4)Hex(4)Fuc(1)         | 4704.08                 | 4704.08                 |
|                  |   | HexNAc(4)Hex(5)Fuc(2)NeuAc(1) | 5303.30                 | 5303.30                 |
|                  |   | HexNAc(3)Hex(5)Fuc(1)NeuAc(2) | 5132.20                 | 5132.18                 |
|                  |   | HexNAc(6)Hex(3)Fuc(1)         | 4948.21                 | 4948.20                 |
|                  |   | HexNAc(5)Hex(4)Fuc(2)         | 5053.23                 | 5053.23                 |
|                  |   | HexNAc(6)Hex(3)Fuc(2)         | 5094.26                 | 5094.26                 |
| N537             | <sup>524</sup> VYHVGLGDAAQPRN*LTK <sup>540</sup>                | HexNAc(1)Fuc(1)               | 2188.12                 | 2188.12                 |
| N537             | <sup>524</sup> VYHVGLGDAAQPRN*LTKR <sup>541</sup>               | HexNAc(5)Hex(4)Fuc(1)         | 3804.75                 | 3804.75                 |
|                  |   | HexNAc(6)Hex(3)Fuc(1)         | 3845.78                 | 3845.78                 |
|                  |   | HexNAc(1)Fuc(1)               | 2344.22                 | 2344.22                 |
|                  |   | HexNAc(6)Hex(3)Fuc(2)         | 3991.83                 | 3991.83                 |

Neuf peptides différents ont été détectés comportant un oligosaccharide sur les cinq asparagines N88, N125, N174, N217 et N537.

Pour confirmer que ces cinq Asn sont bien glycosylées, nous avons réalisé une déglycosylation de HSulf-2 par la PNGase F, une *N*-glycosidase qui coupe les *N*-glycanes au niveau de la liaison entre l'asparagine et le GlcNAc. Cette coupure introduit une désamidation des résidus asparagines déglycosylées, menant à un résidu acide aspartique. La désamidation est détectable car elle conduit à un incrément de masse de +0,984016 (différence entre une fonction NH<sub>2</sub> et OH) sur les spectres MS des peptides déglycosylés (Tableau 6).<sup>131</sup>

**Tableau 6 : Liste des peptides désamidés détectés par nano-LC-MS/MS (CID/ETD) après action de la PNGase sur HSulf-2.** 3 ag de HSulf-2 est digéré par la PNGaseF puis par la trypsine avant injection de 6 pmoles en nanoLC

| Numéro de résidu | Séquence   | Modification        |
|------------------|--|---------------------|
| N88              | <sup>69</sup> SSILTGKYVHNHNTYTNNEN*CSSPSWQAQHEsr <sup>101</sup>      | Désamidation/0.9840 |
|                  | <sup>76</sup> YVHNHNTYTNNEN*CSSPSWQAQHEsr <sup>101</sup>             | Désamidation/0.9840 |
| N125             | <sup>114</sup> TAFFGKYLNEYN*GSYVPPGWKEWVGLLK <sup>141</sup>          | Désamidation/0.9840 |
|                  | <sup>120</sup> YLNEYN*GSYVPPGWK <sup>134</sup>                       | Désamidation/0.9840 |
|                  | <sup>120</sup> YLNEYN*GSYVPPGWKEWVGLLK <sup>141</sup>                | Désamidation/0.9840 |
|                  | <sup>120</sup> YLNEYN*GSYVPPGWKEWVGLLKNSR <sup>144</sup>             | Désamidation/0.9840 |
| N174             | <sup>157</sup> EKHGSDYSKDYLTDLITN*DSVSFFR <sup>181</sup>             | Désamidation/0.9840 |
|                  | <sup>159</sup> HGSDYSKDYLTDLITN*DSVSFFR <sup>181</sup>               | Désamidation/0.9840 |
|                  | <sup>166</sup> DYLDLITN*DSVSFFR <sup>181</sup>                       | Désamidation/0.9840 |
| N217             | <sup>214</sup> LPFN*ASQHITPSYNYAPNPKHWIMR <sub>2</sub> <sup>39</sup> | Désamidation/0.9840 |
|                  | <sup>216</sup> PN*ASQHITPSYNYAPNPKHWIMR <sup>239</sup>               | Désamidation/0.9840 |
| N537             | <sup>514</sup> SVAIEVDGRVYHVGLGDAAQPRN*LTK <sup>540</sup>            | Désamidation/0.9840 |
|                  | <sup>522</sup> GRVYHVGLGDAAQPRN*LTK <sup>540</sup>                   | Désamidation/0.9840 |
|                  | <sup>524</sup> VYHVGLGDAAQPRN*LTK <sup>540</sup>                     | Désamidation/0.9840 |
|                  | <sup>524</sup> VYHVGLGDAAQPRN*LTKR <sup>541</sup>                    | Désamidation/0.9840 |
|                  | <sup>526</sup> HVGLGDAAQPRN*LTK <sup>540</sup>                       | Désamidation/0.9840 |
|                  | <sup>526</sup> HVGLGDAAQPRN*LTKR <sup>541</sup>                      | Désamidation/0.9840 |
|                  | <sup>528</sup> GLGDAAQPRN*LTKR <sup>540</sup>                        | Désamidation/0.9840 |



**Figure 27 : Spectre CID de la fragmentation du peptide YVNHNTYTNEN\*CSSPSWQAQHESR contenant l'asparagine N88 devenu un résidu d'acide aspartique D88 après désamidation.**

3ug de HSulf-2 ont été digéré par la PNGase F puis par la trypsine avant analyse par nanoLC-MS/MS (CID/ETD)

Le Spectre Fig 27 montre l'exemple du peptide YVNHNTYTNEN\*CSSPSWQAQHESR contenant l'asparagine N88 devenu un résidu d'acide aspartique D88 après désamidation. En effet entre les ions  $y^{13}$  ( $m/z$  1502) et  $y^{14}$  ( $m/z$  1617) il y a un delta de masse de 115 qui correspond à un résidu d'acide aspartique. On observe donc la désamidation de l'asparagine N88 en acide aspartique confirmant ainsi que cette position était glycosylée avant action de la PNGaseF.

La détection de 18 différents peptides désamidés pour les cinq mêmes positions le long de la protéine (Tableau 6), confirme la *N*-glycosylation de ces cinq résidus Asn (Tableau 5).

L'analyse CID indique la présence de différentes structures de *N*-glycanes, d'abondance variable.

Tout comme pour l'analyse de la proportion de protéine glycosylée, l'abondance relative de chaque structure a été déterminée à l'aide du chromatogramme d'ion extrait de chaque peptide selon la formule : <sup>132</sup>

$$\text{XIC Ratio} = \frac{\text{Péptide Modifié}}{\text{Péptide Modifié} + \text{Peptide WT}}$$

Nous avons ainsi obtenu des pourcentages d'abondance relative de structure pour chaque position (Fig A 46-50, en annexe) et cela a conduit à une structure majoritaire pour chacun des cinq sites de *N*-glycanes. (Tableau 7). Ces structures majoritaires relèvent de 3 organisations de *N*-glycanes, Man8 et Man5 pour les oligomannoses en position N88, N125 et N174, ainsi qu'une structure complexe HexNAc(6)-Hex(2)-Fuc(2) en position N217 et N537.

**Tableau 7 : Pourcentage relatif des peptides glycosylés les plus abondants pour chaque position sur HSulf-2, estimé à l'aide du logiciel Byologic par Protein Metric.**  
En rouge la structure la plus abondante sur chaque position

| Numéro de résidu | Séquence du peptide   | Modification/8M                               | Composition                   | (M+H) <sup>+</sup> | Abondance relative (%) |
|------------------|---|---|-------------------------------|--------------------|------------------------|
| N88              | <sup>76</sup> YVHNHNTYTNEN*CSSPSWQAQHEsr <sup>101</sup>     | NGlycane/1540,52;<br>Carbamidométhyle/57,0215 | HexNAc(2)Hex(7)               | 4701,83            | 0,87                   |
|                  |   | NGlycane/1378,47                              | HexNAc(2)Hex(6)               | 4481,78            | 2,36                   |
|                  |   | NGlycane/1864,63                              | HexNAc(2)Hex(9)               | 4967,94            | 4,60                   |
|                  |   | NGlycane/1702,58;<br>Carbamidométhyle/57,0215 | HexNAc(2)Hex(8)               | 4863,89            | 5,57                   |
|                  |   | NGlycane/1540,52                              | HexNAc(2)Hex(7)               | 4643,84            | 15,30                  |
|                  |   | <b>NGlycane/1702,58</b>                       | <b>HexNAc(2)Hex(8)</b>        | <b>4805,89</b>     | <b>71,30</b>           |
| N125             | <sup>114</sup> TAFFGKYLNEYn*GSYVPPGWKEWVGLLK <sup>141</sup> | <b>NGlycane/1216,42</b>                       | <b>HexNAc(2)Hex(5)</b>        | <b>4480,08</b>     | <b>67,20</b>           |
|                  |   | NGlycane/1419,50                              | HexNAc(3)Hex(5)               | 4683,16            | 32,80                  |
| N174             | <sup>159</sup> HGSDYSKDYLTLITN*DSVSFFR <sup>181</sup>       | NGlycane/1540,52                              | HexNAc(2)Hex(7)               | 4220,78            | 8,58                   |
|                  |   | NGlycane/1622,58                              | HexNAc(4)Hex(5)               | 4302,84            | 10,10                  |
|                  |   | NGlycane/1378,47                              | HexNAc(2)Hex(6)               | 4058,73            | 15,10                  |
|                  |   | <b>NGlycane/1216,42</b>                       | <b>HexNAc(2)Hex(5)</b>        | <b>3896,68</b>     | <b>66,30</b>           |
| N217             | <sup>214</sup> LFPN*ASQHITPSYNYAPNPDKHWIMR <sup>239</sup>   | NGlycane/1606,58                              | HexNAc(4)Hex(4)Fuc(1)         | 4704,08            | 1,45                   |
|                  |   | NGlycane/2205,79                              | HexNAc(4)Hex(5)Fuc(2)NeuAc(1) | 5303,30            | 2,53                   |
|                  |   | NGlycane/2147,75                              | HexNAc(3)Hex(5)Fuc(1)NeuAc(2) | 5132,20            | 3,27                   |
|                  |   | NGlycane/1850,69                              | HexNAc(6)Hex(3)Fuc(1)         | 4948,21            | 10,00                  |
|                  |   | NGlycane/1955,72                              | HexNAc(5)Hex(4)Fuc(2)         | 5053,23            | 36,30                  |
|                  |   | <b>NGlycane/1996,75</b>                       | <b>HexNAc(6)Hex(3)Fuc(2)</b>  | <b>5094,26</b>     | <b>46,00</b>           |
| N537             | <sup>524</sup> VYHVGLGDAAQPRN*LTKR <sup>541</sup>           | NGlycane/1809,6661                            | HexNAc(5)Hex(4)Fuc(1)         | 3804,75            | 11,40                  |
|                  |   | NGlycane/1850,6926                            | HexNAc(6)Hex(3)Fuc(1)         | 3845,78            | 15,50                  |
|                  |   | NGlycane/349,1373                             | HexNAc(1)Fuc(1)               | 2344,22            | 20,10                  |
|                  |   | <b>NGlycane/1996,7505</b>                     | <b>HexNAc(6)Hex(3)Fuc(2)</b>  | <b>3991,83</b>     | <b>53,10</b>           |

Tous ces sites ne sont pas répartis uniformément le long de la protéine. Les quatre premiers se trouvent sur la chaîne longue, coté N-terminal, où se situe le site catalytique de l'enzyme. On peut donc émettre l'hypothèse que ces oligosaccharides joueraient un rôle dans l'activité catalytique, par exemple en stabilisant l'orientation du substrat dans la poche catalytique par interactions avec ce dernier. Le cinquième site quant à lui, se trouve sur la chaîne courte dans le domaine HD (domaine hydrophile) responsable de l'interaction avec le substrat héparane sulfate.

### 8.1.2 Elucidation des structures des *N*-glycanes

En appliquant la méthodologie CID/ETD nous obtenons deux spectres MS<sup>2</sup> pour chaque glycopeptide, nous permettant de confirmer la structure du peptide et du *N*-glycane. Nous donnerons ici un exemple d'attribution de structure oligomannose et un exemple de structure complexe. Le même travail d'attribution a été effectué sur les 3 autres positions (Fig A.51-53), en annexe.

#### 8.1.2.1 Glycosylation de type oligomannose : l'asparagine N88

On peut observer sur le spectre de fragmentation CID de l'ion précurseur penta-chargé positivement à  $m/z$  962,39 correspondant au peptide glycosylé sur l'asparagine N88 (appelé P-N88) : YVHNHNTYTNEN\*CSSPSWQAQHE SR ( $M+H^+$  théorique 4805,89) (Fig 28.A), la présence de l'ion diagnostique à  $m/z$  366 Hex-HexNAc, et des ions fragments permettant de caractériser la structure du *N*-glycane. L'ion majoritaire à  $m/z$  827,89 chargé 4 fois correspond à ce peptide ayant conservé un résidu glucosamine. On observe très minoritairement des ions de type y correspondant à une fragmentation du squelette peptidique, cependant les ions les plus intenses sont tous issus de la fragmentation du glycane. La série d'ions 4 fois chargés ( $z=4$ ) met en évidence la structure du *N*-glycane porté par le peptide, avec les ions caractéristiques : à  $m/z$  776,86 correspondant à P-N88 ayant conservé le groupement GlcNAc(2)-Man(2), à  $m/z$

1000,20 avec GlcNAc(2)-Man(3), à  $m/z$  1040,79 avec GlcNAc(2)-Man(4), à  $m/z$  1081,23 avec GlcNAc(2)-Man(5), à  $m/z$  1122,04 avec GlcNAc(2)-Man(6), à  $m/z$  1162,30 avec GlcNAc(2)-Man(7). Cette fragmentation nous permet de déterminer avec certitude la structure du glycane porté par N88 qui est ici GlcNAc(2)-Man(8).

Le spectre Fig 28.B correspond au même ion précurseur à  $m/z$  962,39 soumis à une fragmentation par ETD qui permet de conserver le glycane lié au peptide, mais aussi de déterminer la séquence peptidique porteuse du *N*-glycane. On détecte dans ce spectre les ions  $z_1$  à  $z_8$  et  $c_1$  à  $c_4$ . Ces ions correspondent à la fragmentation du peptide en partant de chaque extrémité (C-ter et N-ter respectivement) avant le *N*-glycane. Les ions  $c_{13}$  et  $z_{14}$  correspondant respectivement aux ions fragments de part et d'autre de N88 ne sont pas détectés. On observe cependant les ions  $c_{15}^{2+}$  et  $z_{17}^{2+}$  porteurs du sucre, qui nous permettent de confirmer la présence du glycane sur le peptide.



— peptide (Y<sub>76</sub>VHNHNTYTNEN\*CSSPSWQAQHESR<sub>101</sub>)

■ N-Acetylglucosamine (GlcNAc) 203 Da

● Mannose (Man) 162 Da

N 88

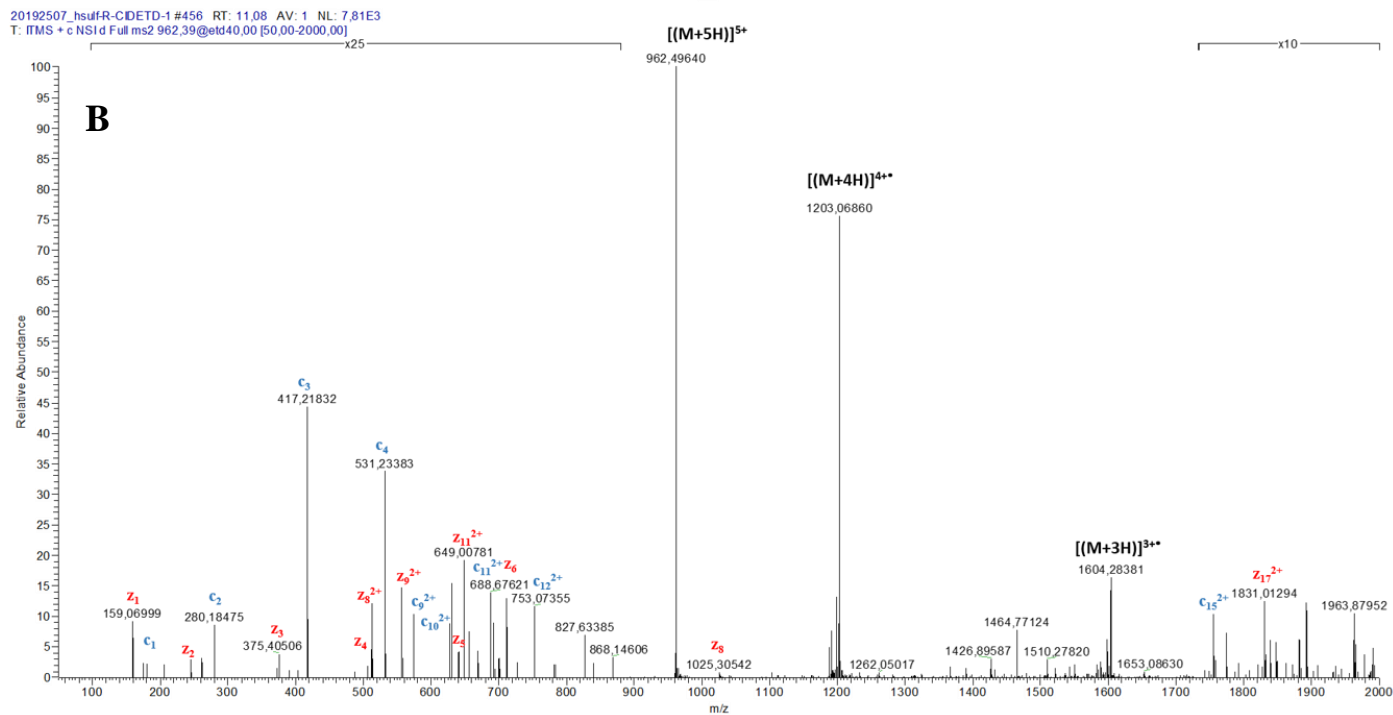
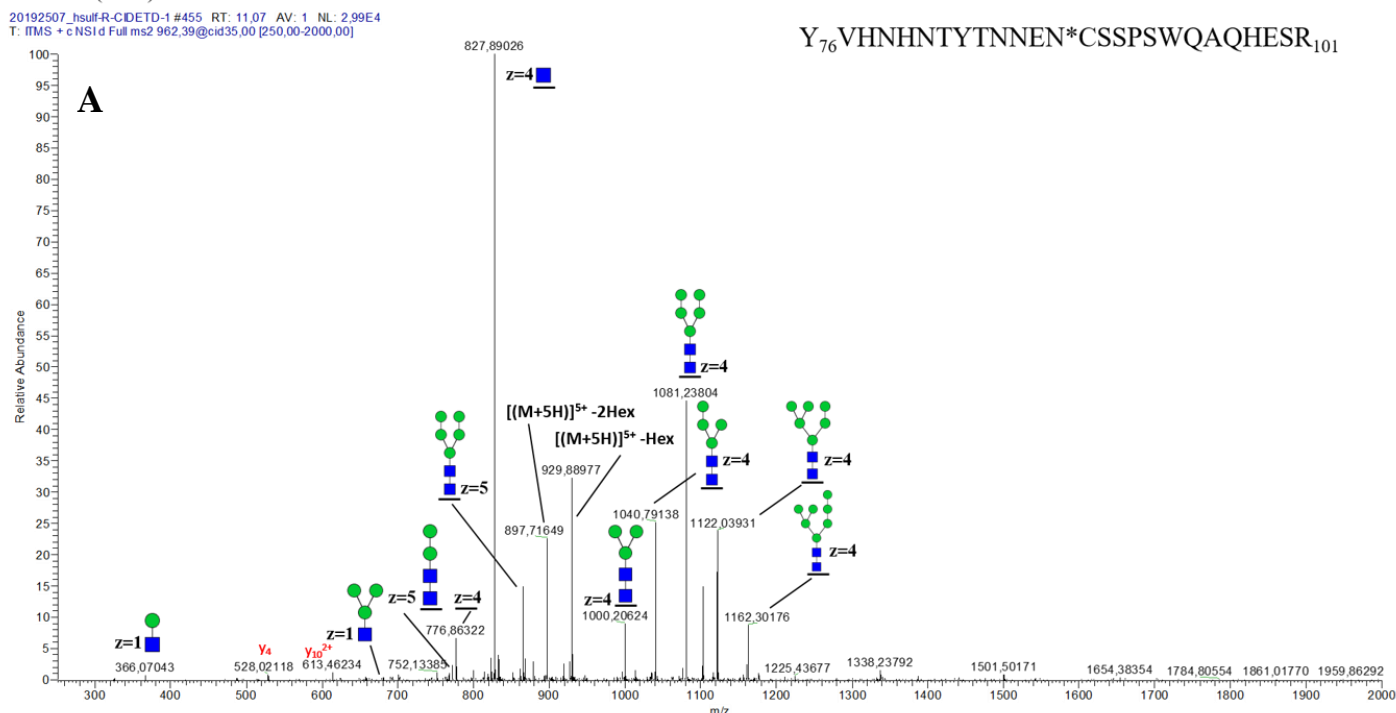


Figure 28 : Spectres nanoLC-ESI-MS-MS de l'ion précurseur à *m/z* 962,39, glycopeptide portant l'asparagine N88.

(A) fragmentation CID en mode positif avec énergie de collision normalisée à 35% ; (B) fragmentation ETD en mode positif, avec le fluoranthène comme réactif et une énergie de collision normalisée à 40%

### 8.1.2.2 Glycosylation de type complexe : l'asparagine N217

On peut observer sur le spectre de fragmentation CID de l'ion précurseur penta-charge positivement à  $m/z$  850,22 correspondant au peptide glycosylé sur l'asparagine N217 (appelé P-N217) : LFPN\*ASQHITPSYNYAPNPDKHWIMR ( $M+H^+$  théorique 5095,26) (Figure 29.A), la présence d'un ion diagnostique d'un oligosaccharide complexe à  $m/z$  350 DesoxyHex-HexNAc, et des ions fragments permettant de caractériser la structure du *N*-glycane. L'ion majoritaire à  $m/z$  1136,22 chargé 4 fois correspond à ce peptide ayant conservé une partie de la structure du *N*-glycane, à savoir 4HexNAc-3Hex-1DesoxyHex. Tout comme pour le peptide P-N88 la série d'ions 4 fois chargés ( $z=4$ ) met en évidence la structure du *N*-glycane porté par le peptide, avec les ions caractéristiques : à  $m/z$  825,66 correspondant au peptide portant la N217 ayant conservé une glucosamine GlcNAc(1), à  $m/z$  876,64 avec GlcNAc(2), à  $m/z$  1044,55 avec GlcNAc(3)-Man(2)-Fuc(1), à  $m/z$  1096,02 avec GlcNAc(4)-Man(2)-Fuc(1), à  $m/z$  1136,22 avec GlcNAc(4)-Man(3)-Fuc(1) et à  $m/z$  1173,25 avec GlcNAc(4)-Man(3)-Fuc(2). L'ion précurseur détecté et cette fragmentation nous permettent de déterminer la structure du glycane porté par N217 qui est ici GlcNAc(6)-Man(3)-Fuc(2).

Le spectre Figure 29.B correspond au même ion précurseur à  $m/z$  850,22 soumis à une fragmentation par ETD. On détecte dans ce spectre les ions  $z_1$  à  $z_4$  et  $c_1$ - $c_3$ . Ces ions correspondent à la fragmentation du peptide en partant de chaque extrémité (C-ter et N-ter respectivement) avant le *N*-glycane. Contrairement au peptide P-N88, on détecte l'ion  $c_4^{2+}$  correspondant à l'ion fragment de l'asparagine portant le sucre par l'extrémité N-ter. On observe également les ions  $c_6^{2+}$ ,  $c_{13}^{2+}$  et  $c_{15}^{2+}$  porteur du sucre, qui nous permettent de confirmer la présence du *N*-glycane sur le peptide.

La structure complexe de l'asparagine N217 contient deux résidus fucose. La fucosylation des antennes de *N*-glycane, a déjà été observée sur différentes protéines de la membrane extracellulaire ou encore secrétées hors de la cellule.<sup>133,134</sup>

On peut citer l'exemple de MUC1, un antigène associé aux tumeurs qui montre une forte glycosylation *in vivo*.<sup>134</sup> Une analyse par glycoprotéomique a également permis l'identification du récepteur CD98 à la surface cellulaire comme porteur d'une grande population de glycanes multi-antennés fortement fucosylés.<sup>133</sup> CD98 est un acteur du processus de métastase, il agit comme co-récepteur des intégrines  $\beta$  et amplifie leur signalisation régulant ainsi la migration et l'adhésion cellulaire.<sup>135</sup>

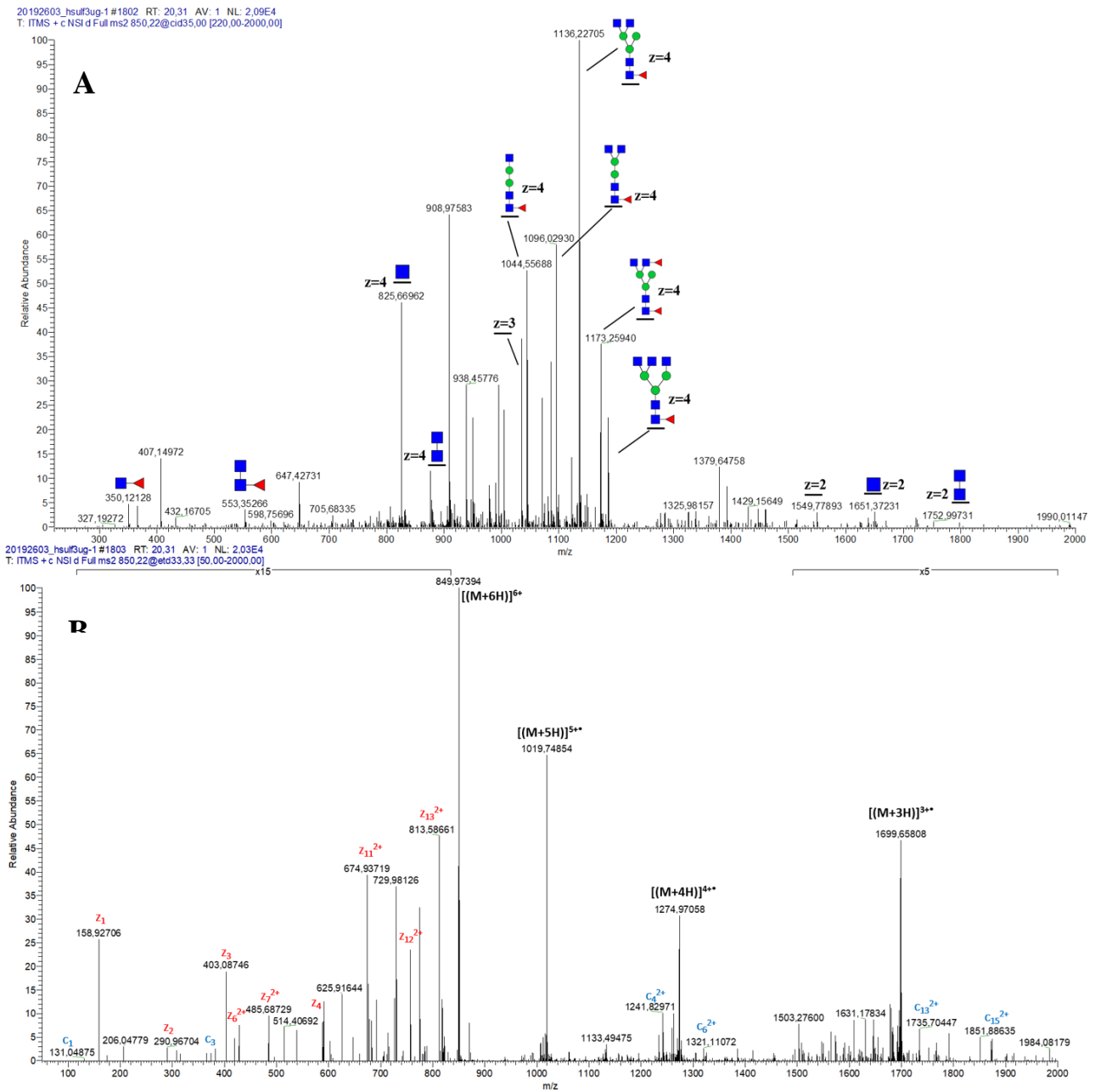
On peut également citer l'exemple de l'interaction avec le GalMBP. Le GalMBP est un fragment de protéine de liaison du mannose qui a été modifié pour créer une sonde pour les ligands contenant du galactose. Il est utilisé pour le dépistage de cancer, car il a été démontré que le domaine de reconnaissance des glucides du GalMBP se lie sélectivement à des groupes de glycanes associés aux tumeurs.<sup>133</sup> La capacité des lignées cellulaires tumorales MCF7 (cancer du sein) à se lier au GalMBP varie considérablement et reflète l'hétérogénéité des niveaux de glycanes *N*-fucosylés sur leurs parties terminales, à savoir les antennes.<sup>133</sup>

Il semblerait donc que cette fucosylation des antennes soit un critère important pour l'interaction des protéines intervenant dans différents cancers et notamment dans le cancer du sein dont on sait que HSulf-2 est un biomarqueur.<sup>66,136,137</sup>

— peptide (L<sub>214</sub>FPN\*ASQHITPSYNYAPNPKHWIMR<sub>239</sub>)  
 ■ N-Acetylglucosamine (GlcNAc) 203 Da  
 ● Mannose (Man) 162 Da  
 ▲ Fuco (Fuc) 146 Da

N 217

L<sub>214</sub>FPN\*ASQHITPSYNYAPNPKHWIMR<sub>239</sub>



**Figure 29: Spectres nanoLC-ESI-MS-MS de l'ion précurseur à  $m/z$  850,22, glycopeptide portant l'asparagine N217.**

(A) fragmentation CID en mode positif avec énergie de collision normalisée à 35% ; (B) fragmentation ETD en mode positif, avec le fluoranthène

Les travaux antérieurs avaient mis en évidence qu'en combinant la déglycosylation par la *N*-glycosidase PNGase F et une analyse protéomique, au moins 4 des 12 sites potentiels de

*N*-glycosylation étaient glycosylés.<sup>94</sup> La fragmentation par CID des peptides issus de la digestion trypsique de HSulf-2 a généré dans certains spectres MS/MS des ions oxonium Hex-HexNAc diagnostiques permettant l'identification des glycopeptides. Leur fragmentation par ETD a permis le séquençage de leur squelette peptidique sans fragmentation de la partie glycane, ce qui a aidé à identifier la position de la chaîne de sucre.<sup>129</sup> Cette stratégie combinée CID/ETD a conduit à l'identification de cinq structures de *N*-glycane.

Ces asparagines sont localisées dans les deux chaînes de HSulf-2. Nous notons que l'asparagine N537 se trouve au milieu du site d'interaction de HSulf-2. Cela pourrait signifier que cette *N*-glycosylation est également impliquée dans les processus de reconnaissance avec le substrat.

L'implication de la *N*-glycosylation dans sa localisation à la surface des cellules mais aussi dans les propriétés enzymatiques de Sulf reste inconnue. Une des possibilités serait que la *N*-glycosylation des Sulfs est nécessaire pour maintenir un bon repliement de la protéine. Une alternative serait que les *N*-glycane participeraient à la régulation de l'activité enzymatique, par exemple en liant et en présentant les substrats d'héparane sulfate au site catalytique. En effet, il a été montré sur l'orthologue aviaire QSulf-1, que la *N*-glycosylation joue un rôle important dans le maintien de l'activité endosulfatase. Des expériences ont montré que la version non *N*-glycosylée de QSulf1 a une affinité réduite avec l'héparine comparée à la forme *N*-glycosylée.<sup>93</sup> D'autres études sont nécessaires pour mieux comprendre les exigences structurales de *N*-glycosylation pour la fonction de Sulf.

Comme indiqué dans le chapitre 2, la masse totale de HSulf-2 a été déterminée par MALDI-TOF.<sup>94</sup> Cette enzyme a une masse moléculaire expérimentale de 133 115 Da malgré une masse moléculaire théorique de 98 170 Da pour le squelette peptidique. On a donc une différence de 34 964 Da correspondant à des modifications post-traductionnelles. On sait

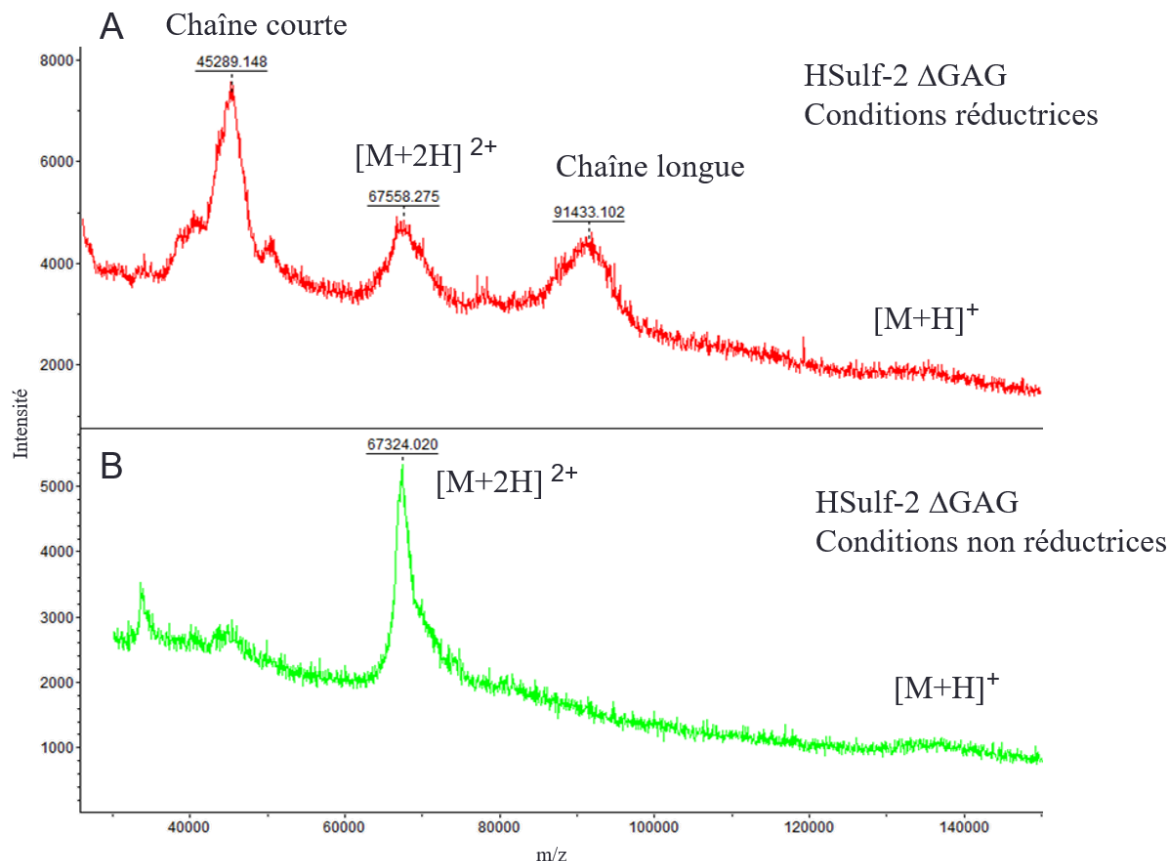
maintenant que HSulf-2 porte une chaîne de chondroïtine d'une masse moléculaire de 24,7 kDa. Par soustraction, la masse correspondant aux *N*-glycanes ou à d'autres modifications post-traductionnelles serait de 10,2 kDa. Avec les cinq *N*-glycanes identifiés dans ces études, nous avons une masse totale de 131,1 kDa pour la protéine. Il manquerait donc environ 2000 Da qui pourrait correspondre à un *N*-glycane non couvert parmi les sites potentiels (N108, N147, N584, N740) ou une autre modification non identifiée aujourd'hui.

## 8.2 Analyses des ponts disulfure de HSulf-2

La séquence protéique de HSulf-2 comprend vingt-trois résidus de cystéine dont certains sont impliqués dans des liaisons disulfure comme indiqué par la variation de mobilité en électrophorèse ou par celle des masses en MS dans des conditions réductrices et non réductrices. L'analyse par MALDI-TOF MS (Fig 30.B) a révélé en conditions non-réductrices, un ion correspondant à l'enzyme entière à  $m/z$  134 650 se scindant en deux espèces à  $m/z$  91 433 et à  $m/z$  45 289 en conditions réductrices (Fig 30.A). Ces deux espèces correspondraient aux deux bandes de HSulf-2. Sur gel d'électrophorèse, après digestion du GAG, on distingue également les deux chaînes de masse moléculaire à 79 kDa et 50 kDa (Fig 13.A chapitre précédent) en conditions réductrices. Ces résultats montrent que des ponts disulfure sont impliqués dans la liaison des deux chaînes de HSulf-2, et nous avons voulu les caractériser.

Pour obtenir ces spectres nous avons supprimé le GAG de la protéine à l'aide de la chondroïtinase AC afin d'obtenir une Hsulf-2 dégagoylée. La chondroïtinase AC est une enzyme digérant spécifiquement les chondroïtines de type A et C. Nous n'avons pas utilisé la chondroïtinase ABC, moins spécifique, car cette dernière est conditionnée dans une solution contenant de la BSA. La BSA ou albumine de sérum bovin est une protéine souvent utilisée pour stabiliser d'autres protéines en solution. Cependant elle induit des signaux parasites empêchant une bonne interprétation du spectre d'HSulf-2. Une alternative est l'emploi de la

hyaluronidase, mais elle demande un long temps de réaction, 48h, et nous ne sommes pas certains que la réaction soit totale même après ce temps.



**Figure 30 : Spectres MALDI-TOF de HSulf-2 dégagossylée en conditions (A) réductrices et (B) non réductrices**

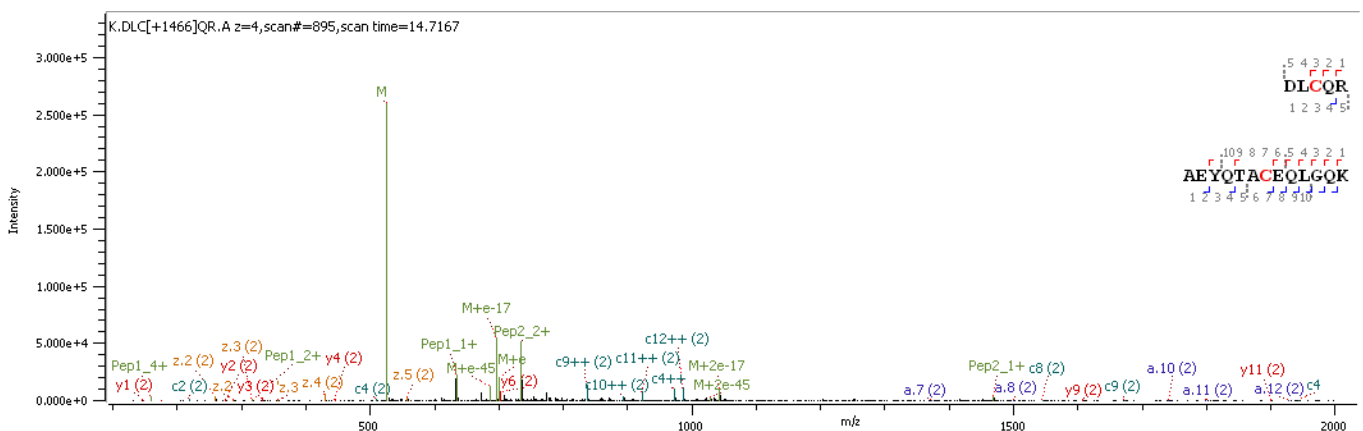
2  $\mu$ g HSulf-2 + Matrix SA (50:50:0,1 H<sub>2</sub>O :ACN:TFA), LP 22-150 kDa, polarité positive, tension à 40 kV, fréquence du laser à 2000 Hz, délai d'extraction d'ions à 400 ns, accumulation de 6000 tirs.

Nous avons déterminé les motifs de liaison disulfure dans HSulf-2 en utilisant la dissociation par transfert d'électrons (ETD) pour fragmenter les peptides liés par un pont disulfure formés lors de la digestion par la trypsine dans des conditions non réductrices. Etant donné sa capacité à fragmenter préférentiellement ces liaisons plutôt que le squelette

peptidique, l'ETD est devenue une méthode puissante pour caractériser ces ponts disulfure par MS.<sup>138 139</sup>

Les peptides produits par la digestion tryptique de HSulf-2 en conditions non réductrices ont été analysés par nano-LC-MS/MS en mode de fragmentation par ETD. Sept peptides reliés par des ponts disulfure ont été détectés, principalement situés dans le domaine HD (Tableau 8). Cette analyse a été réalisée sur HSulf-2 entière (Tableau 8.A) mais également sur son domaine HD isolé, exprimé en bactérie (Tableau 8.B).

L'interprétation des spectres a été effectuée à l'aide du logiciel Byonic de Protein Metrics. On peut voir l'exemple du pont C422-C431 (Fig 31). Le même travail a été effectué pour chaque peptide du tableau 7 (Fig A.54-63, en annexe).



**Figure 31 : Spectre ETD de HSulf-2 en conditions non réductrices montrant les peptides**

**DLC\*QR et AEYQTAC\*EQLGQK reliés par un pont disulfure. M= [(M+4H)]<sup>4+</sup>**

3 ag de HSulf-2 ont été digérés par la trypsine en conditions non réductrices et analysés par nanoLC-ESI-MS/MS par fragmentation ETD. Annotation par le logiciel Byonic : Pep1 = DLCQR, Pep2 = AEYQTACEQLGQK. Les annotations (1) et (2) correspondent respectivement aux ions fragments des peptides 1 et 2. Les résidus de cystéines liés sont en rouge.



Tableau 8 : Tableau récapitulatif des peptides de HSulf-2 liés par des ponts disulfure. (A) HSulf-2 entière, (B) domaine HD isolé.

A

| Séquence                             | Numéro de résidu      | Etat de charge | m/z mesuré | m/z calculé | Modification                        | RT (min) |
|--------------------------------------|-----------------------|----------------|------------|-------------|-------------------------------------|----------|
| C*K<br>AEYQTAC*EQLGQK                | C453-C431             | 3              | 1758,77    | 1758,77     | X                                   | 13,45    |
| YVHNHNTYTNENC*SSPSWQAQHESR<br>QC*NPR | C89-C798              | 5              | 4608,81    | 3716,56     | Nglycane /<br>+892,32 (HexNAc2Hex3) | 11,03    |
| DLC*QR<br>WQC*VEDATGK                | C422-C440             | 3              | 1767,77    | 1767,77     | X                                   | 14,68    |
| DLC*QR<br>AEYQTAC*EQLGQK             | C422-C431             | 4              | 2099,93    | 2099,94     | X                                   | 14,71    |
| AEYQTAC*EQLGQK<br>QC*NPR             | C431-C798             | 4              | 2431,11    | 2431,11     | X                                   | 11,58    |
| KRPEEC*DC*H<br>YYGQGSEAC*TC*DSGDYK   | C480-C636 / C482-C638 | 4              | 3086,21    | 3086,21     | X                                   | 11,21    |
|                                      |                       |                |            |             |                                     |          |
| RIMEQGGAHFINAFVTTPMC*CPSR            | C64                   | 4              | 2647,21    | 2665,24     | FormylGly / -17,99                  | 23,57    |

B

| Séquence                            | Numéro de résidu      | Etat de charge | m/z mesuré | m/z calculé | Modification           | RT (min) |
|-------------------------------------|-----------------------|----------------|------------|-------------|------------------------|----------|
| YYGQGSEAC*TC*DSGDYK                 | C480-C482             | 3              | 1844,66    | 1844,67     | X                      | 14.71    |
| DLC*QR<br>WQC*VEDATGK               | C422-C440             | 4              | 1767,78    | 1767,77     | X                      | 14.15    |
| DLC*QR<br>AEYQTAC*EQLGQK            | C422-C431             | 4              | 2099,95    | 2099,94     | X                      | 14.4     |
| C*K<br>AEYQTAC*EQLGQK               | C453-C431             | 3              | 1758,78    | 1758,78     | Nterm Carbamyl / 43,01 | 12.53    |
| KRPEEC*DC*HK<br>YYGQGSEAC*TC*DSGDYK | C480-C636 / C482-C638 | 5              | 3086,21    | 3086,20     | X                      | 10.83    |

Parmi les ponts disulfure identifiés, trois sont intramoléculaires au sein de la chaîne longue. Ils impliquent la Cys422 dans deux ponts disulfure avec la Cys431 (Cys422-431) ou la Cys440 (Cys422-440), et la Cys431 dans la liaison disulfure Cys431-453. On observe également deux liaisons disulfure intermoléculaires impliquant les Cys 480, 482, 636 et 638. Ces cystéines sont reliées deux à deux mais leur proximité empêche de déterminer avec exactitude les ponts formés. Ces cystéines relient la chaîne longue et la chaîne courte. Ces ponts ont la particularité d'être séparés par un seul résidu, mais ont été systématiquement détectés dans chaque analyse en triplicat. Ces deux ponts disulfure intermoléculaires ont également été détectés dans le domaine HD isolé.

En combinant ces résultats, on peut représenter la disposition des ponts disulfure le long de la séquence protéique de HSulf-2 (Fig 32).

```

1  FLSHHRLKGR FQRDRRNIRP NIILVLTDDQ DVELGSMQVM NKTRRIMEQG
51  GAHFINAFVT TPMCCPSRSS ILTGKYVHNH NTYTNNENCS SPSWQAQHE89S
101 RTFAVYLNST GYRTAFFGKY LNEYNGSYVP PGWKEWVGLL KNSRFYNYTL
151 CRNGVKEKHG SDYSKDYLTD LITNDSVSFF RTSKKMYPHR PVL MVISHAA
201 PHGPEDSAPQ YSRLFPNASQ HITPSYNYAP NPDKHWIMRY TGPMKPIHME
251 FTNMLQRKRL QTLMSVDDSM ETIYNMLVET GELDNTYIVY TADHGYHIGQ
301 FGLVKGKSMP YEFDIRVPFY VRGPNVEAGC LNPHIVLNID LAP TILDIAG
351 LDIPADM453DGK SILKLLDTER PVNRFHL422KKK MRVWRDSFLV ERGKLLHKRD431 440
401 NDKVDAQEEN FLPKYQRVKD LCQRAEYQTA CEQLGQKWQC VEDATGKLKL
451 HKCKGPMRLG GSRALSNLVP KYYGQGSEAC480 TCDSDYKLS482 LAGRRK798KL798FK
501 KKYKASYVRS RSIR

          SVAIEV DGRVYHVGLG DAAQPRNLTK RHWPGAPEDQ
551 DDKDGGDFSG TGGLPDYSAA NPIKVTHRCY ILENDTVQCD LDLYKSLQAW
601 KDHKLHIDHE IETLQNKIKN LREVRGHLKK KRPEECDCHK ISYHTQHKGR
651 LKHRGSSLHP FRKGLQEKDK VLLREQKRK KKLKLLKRL QNNDTCSMPG
701 LTCFTHDNQH WQTAPFWTLG PFCACTSANN NTYWCMRTIN ETHNFLFCEF
751 ATGFLEYFDL NTDPYQLMNA VNTLDRDVLN QLHVQLMELR SCKGYKQCNP
801 RTRNMDLGLK DGGSYEQYRQ FQRRKWPEMK RPSSKSLGQL WEGWEG

```

**Figure 32: Représentation des ponts disulfure identifiés sur la séquence protéique de HSulf-2**

Afin d'étudier toutes les autres possibilités de modifications sur des cystéines, plusieurs modifications communes de la cystéine ont été recherchées (Tableau 9). Parmi celles-ci, on retrouve la modification formylglycine. Nous pouvons confirmer qu'aucune autre modification des résidus cystéines n'est présente sur la protéine. Le résidu formylglycine est également bien détecté et identifié par nanoLC-MS/MS (Tableau 8).

**Tableau 9 : Modifications principales des résidus cystéine et incréments de masse en résultant**

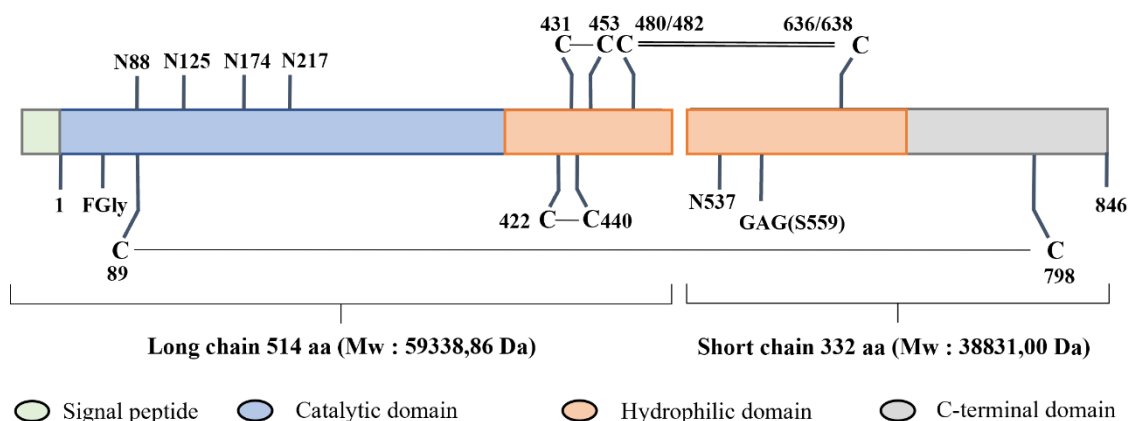
| <b>PTM</b>           | <b><math>\Delta</math> MONOISOTOPIC MASS</b> |
|----------------------|--|
| <b>OXYDATION</b>     |  |
| Cys , Ser            | -15.977156                                   |
| Dehydroalanine       | -33.987721                                   |
| Disulfide            | -2.0145                                      |
| Selenylation         | +79.916520                                   |
| Sulfenic acid        | +15.994915                                   |
| Sulfinic acid        | +31.98983                                    |
| S-nitrosylation      | +28.990164                                   |
| Thiosulfonic acid    | +63.961901                                   |
| <b>ACYLATION</b>     |  |
| Cysteinylation       | +119.004099                                  |
| Diacylglycol         | +576.511761                                  |
| Farnesylation        | +204.187801                                  |
| Geranyl-geranylation | +272.250401                                  |
| Glutathionylation    | +305.068156                                  |
| Palmitoylation       | +238.229666                                  |
| S-guanylation        | +344.039610                                  |
| <b>OTHERS</b>        |  |
| Carbamidomethyl      | +57.021464                                   |
| Formylglycine        | +17.992806                                   |
| Pyridylethyl         | +105.0578                                    |

Les ponts disulfure peuvent être créés au sein de la cellule par catalyse enzymatique ou de façon spontanée.<sup>140</sup> Nous avons pu les détecter, à la fois dans la protéine entière produite dans la cellule eucaryote mais aussi dans le domaine HD produit en bactérie. Nous pouvons en déduire que la formation de liaison disulfure dans HSulf-2 se produit selon un mécanisme spontané et ne dépend pas de la maturation par la protéine furine qui est absente dans le système bactérien. Différents types de liaisons disulfure ont été identifiés dans HSulf-2. Des ponts disulfure inter-chaîne dans le domaine HD, qui semblent montrer un besoin important de repliement dans le domaine d'interaction, mais aussi une liaison très distante au niveau de la séquence de HSulf-2 entre Cys89 et Cys798 qui doit être également essentielle pour la structure tertiaire de la protéine. Les informations sur le repliement que pourrait avoir HSulf-2 du fait de

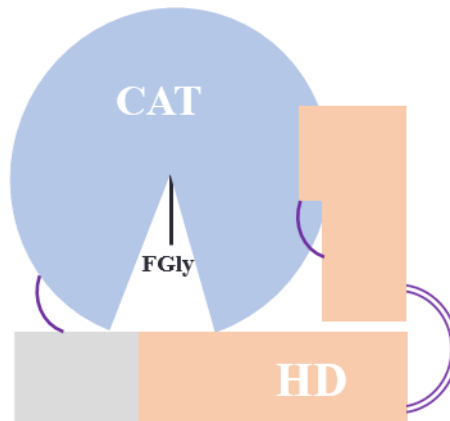
ces ponts disulfure devraient faciliter les études des relations structure-fonction de cette classe de 6-O-endosulfatase, y compris HSulf-1, et aider à la production d'inhibiteurs thérapeutiques.

Pour conclure, nous avons pu déterminer la position de cinq *N*-glycanes sur les asparagines N88, N125, N174, N217 et N537 et leur structure majoritaire pour chaque site. La méthodologie CID/ETD nous a permis de confirmer avec certitude ces deux informations. Le rôle des *N*-glycanes dans la protéine reste encore à déterminer mais plusieurs hypothèses ont été formulées de par leur position le long de la chaîne protéique. Les quatre premiers sites pourraient avoir un rôle dans l'orientation du substrat. Le cinquième pourrait jouer un rôle dans l'interaction avec le substrat mais aussi dans le processus de maturation de la protéine.

Suite à cela, nous avons cherché d'autres modifications post-traductionnelles importantes pour l'organisation structurale et avons identifié sept ponts disulfure. Une majorité d'entre eux, situés au niveau de HD, pourrait avoir pour rôle de créer une contrainte dans le domaine HD afin de faciliter la présentation du substrat au site catalytique. Le dernier pont reliant la partie N-terminale à la partie C-terminale pourrait également contribuer au maintien de la structure tertiaire (Fig 33 et 34).



**Figure 33: Schéma représentant la répartition des modifications post-traductionnelles identifiées sur HSulf-2**



**Figure 34: Hypothèse de repliement 3D de HSulf-2**

En orange le domaine hydrophile, en bleu le domaine catalytique, en gris le domaine C-terminal et en violet les ponts disulfure

Les résidus impliqués dans les ponts disulfure ayant été identifiés, il pourrait être intéressant de faire des mutations sur ces derniers afin de quantifier leur impact sur la structure et l'activité de l'enzyme.

Outre leur impact structural, ces MPTs peuvent également influencer l'activité catalytique. Pour observer cela, il faudrait tout d'abord mettre au point une méthode de suivi cinétique de l'activité endosulfatase de HSulf-2. Cela permettrait également de tester le rôle d'autres modifications telles que les *N*-glycanes ou la chaîne de GAG que nous avons caractérisée. C'est ce sur quoi nous nous pencherons dans le prochain chapitre.

## **Chapitre 4 : Influence des modifications post-traductionnelles sur l'activité sulfatase de HSulf-2**

Dans ce chapitre nous explorerons l'impact des modifications post-traductionnelles sur l'activité sulfatase de HSulf-2. Après avoir déterminé la structure primaire quasi complète de la protéine ainsi que ses modifications post-traductionnelles, nous nous sommes intéressés à l'influence qu'elles pouvaient avoir sur son activité. Nous avons caractérisé une chaîne de chondroïtine sulfate, mais à ce stade nous ne savons pas si elle joue un rôle qu'il soit structural ou catalytique. Influence-t-elle l'activité de l'enzyme d'une façon ou d'une autre? Pour répondre à ces questions, nous chercherons dans un premier temps à mettre au point un protocole de suivi cinétique de l'activité sulfatase puis à mesurer l'activité de HSulf-2 sur un substrat synthétique. Nous essaierons enfin de mesurer son activité sur son substrat naturel.

## 9.1 Mesure d'activité arylsulfatase sur le substrat synthétique 4-MUS

### 9.1.1 Méthodes de la littérature

Pour réaliser le suivi d'une réaction enzymatique, il est possible de mesurer soit la disparition du substrat soit l'apparition du produit. Cette mesure peut être faite soit en continu, en suivant la réaction sans interruption, soit par une mesure unique dite en point final, où le produit formé ou le substrat restant est déterminé à un seul temps.

Dans le cas de l'activité sulfatase, la difficulté réside dans la détection du sulfate libéré. De plus le substrat HS de HSulf-2, de nature polysaccharidique, ne possède pas de chromophore qui permettrait la détection par des méthodes classiques telle que la spectrophotométrie UV/Visible. Enfin, la désulfatation de HS par HSulf-2 est régiosélective et ne concerne qu'une faible proportion des groupes sulfate du polysaccharide substrat.<sup>141</sup> Même s'il est possible de détecter ce substrat, il est difficile de suivre la faible variation du nombre de sulfate du polysaccharide et donc de suivre sa transformation.

Face à la difficulté de suivre l'activité (endo)sulfatase sur le polysaccharide, nous nous sommes tournés vers une seconde activité connue des sulfatases, qui est l'activité arylsulfatase (ARS). De nombreuses sulfatases eucaryotes ont d'abord été identifiées comme des arylsulfatases<sup>2</sup> car elle possède une activité sur des petits substrats aromatiques tel que le para-nitrophenol sulfate (pNPS), para-nitrocatechol sulfate (pNCS) ou encore le 4-méthylumbelliféryle sulfate (4-MUS). Il existe aujourd'hui une classification des sulfatases en deux types : ARS et non-ARS.<sup>142</sup> Le substrat fluorochrome le plus courant pour le dosage de ces arylsulfatases (ARS) est le 4-méthylumbelliféryle sulfate (4-MUS). Le 4-MUS est une molécule constituée d'une fonction coumarine substituée en position 4 par un groupement sulfate. La libération de ce groupe sulfate par une arylsulfatase permet la libération de la



fonction hydroxy-coumarine fluorescente à 465 nm (Fig 35). HSulf-2 est active sur le 4-MUS et est donc une ARS en plus d'être une endosulfatase.<sup>98</sup>

La mesure de l'activité ARS de HSulf-2 sur le 4-MUS a été décrite pour la première fois en 2002 par Morimoto *et al.* Pour ce faire, ils ont effectué une mesure en arrêtant la réaction à différents temps par ajout d'un tampon basique dans le milieu réactionnel.<sup>21</sup> Ces expériences ont permis de déterminer une activité de 1000-2000 nmoles de 4-MU formés/min/mg de HSulf-2.<sup>2</sup>

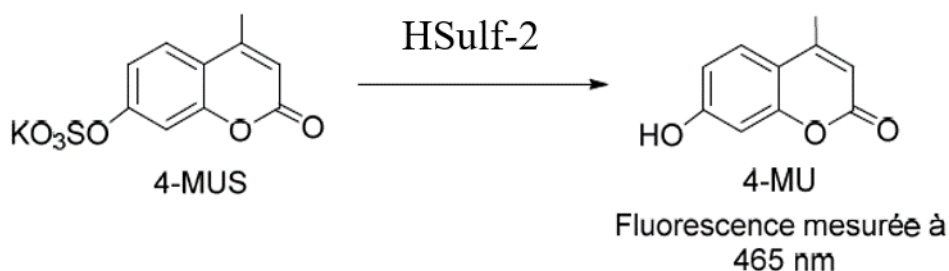


Figure 35 : Structure du 4-Méthylumbelliféryle sulfat (4-MUS) et de son produit d'hydrolyse (4-MU).

Le suivi de l'activité sur le substrat naturel HS est complexe et a donc été effectué de façon indirecte. L'héparine après incubation avec HSulf-2 est digérée par différentes héparinases afin de produire des disaccharides analysables par diverses techniques telles que l'HPLC<sup>143</sup> ou la spectrométrie de masse MALDI-TOF<sup>104</sup>. Le taux de disaccharides sulfatés est ensuite comparé à celui du substrat non traité par HSulf-2.<sup>21,98</sup> Ces études ont permis de déterminer une activité de 0,097 nmole de substrat/min/mg d'HSulf-2.<sup>2</sup>

Le point commun de ces méthodes est la mesure du produit de la réaction après un temps donné de réaction (mesure en point final).<sup>100</sup>

Plutôt qu'une mesure en un seul point final, nous avons décidé de mettre en œuvre une mesure en continu de l'activité ARS de HSulf-2, ce qui a conduit à une adaptation des conditions usuelles décrites sur une sulfatase modèle extraite de l'escargot *Helix pomatia*.

### 9.1.2 Mesure en continu de l'activité

Pour effectuer un suivi cinétique en continu, nous avons utilisé un lecteur de plaque 96 puits en fluorescence. Cet instrument pouvant être thermostaté permet de programmer des mesures à intervalles réguliers sur une période donnée sans avoir à interrompre la réaction ni à effectuer des prélèvements.

Les réactions et mesures ont été effectuées dans des plaques 96 puits ayant la particularité de ne pas absorber le rayonnement UV afin de permettre l'excitation à 360 nm du produit 4-MU formé.

Pour mettre au point la méthode, nous avons tout d'abord utilisé comme modèle une sulfatase d'*Helix pomatia* commerciale. Cette sulfatase (EC 3.1.6.1) est une aryl-sulfate sulfohydrolase qui tout comme HSulf-2 catalyse la désulfatation grâce au résidu formylglycine présent dans son site catalytique.<sup>144,145</sup>

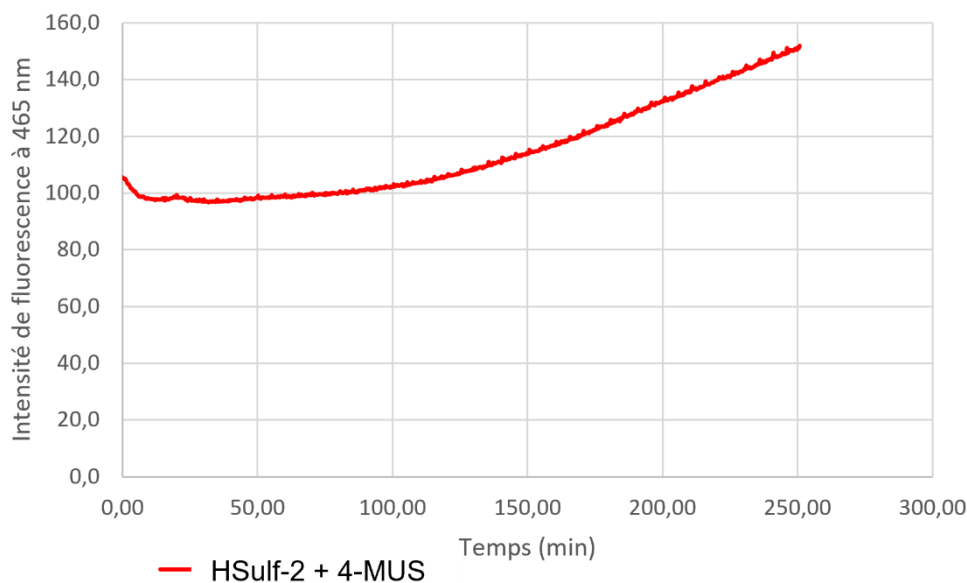
Il faut noter qu'ici la mesure a lieu à pH acide (5), pH de la réaction optimal pour la sulfatase d'*Helix pomatia*, alors que par la méthode en point final, la littérature préconise de travailler à pH basique (10,7) au moment de la mesure. Ce pH basique induit l'arrêt de la réaction et permet une déprotonation du 4-MU passant d'une forme alcool à alcoolate. Cette dernière fonction chimique, a une intensité en fluorescence plus élevée que la fonction alcool. Réaliser une mesure en continu sans cette variation de pH entraîne donc une plus faible intensité de réponse fluorescente et donc une baisse de sensibilité.

Nous avons effectué des mesures toutes les 20 secondes à pH 5 sans arrêter la réaction. Nous avons pu observer que la fluorescence qui atteignait 5000 unités lors de la mesure à pH basique ne dépasse pas 1300 unités de fluorescence en suivi en continu. Malgré la diminution d'intensité du signal, nous avons pu confirmer qu'il reste possible de suivre la désulfatation du 4-MUS en 4-MU par cette méthode.

Cette approche de mesure de fluorescence sans changement de pH ayant été testée sur *H. pomatia*, nous l'avons mise en œuvre pour le suivi de l'activité arylsulfatase de HSulf-2 sur le 4-MUS.

## 9.2 Suivi en continu de l'activité d'HSulf-2 sur le 4-MUS

L'activité d'HSulf-2 étant optimale à pH neutre et à 37°C, nous avons effectué une mesure de l'intensité de fluorescence du 4-MU à pH 7,5 afin de vérifier que l'intensité de fluorescence était bien mesurable. Une fois cela confirmé et après ajustement des rapports enzyme/substrat, nous avons réalisé un suivi cinétique pendant 4h avec une mesure toutes les 20 secondes (Fig 36).



**Figure 36 : Cinétique de désulfatation du 4-MUS par HSulf-2 WT, suivi par fluorescence à 465 nm**

2 ag de HSulf-2 sont ajoutés à du 4-MUS 20 mM dans un tampon Tris 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, pH 7,5. La réaction a lieu directement sur la plaque 96 puits et est suivie 4h à 37°C. Un point de mesure toutes les 20 s. (Résultat d'une seule mesure)

On observe une variation d'intensité de fluorescence due à l'activité ARS de HSulf-2 mesurable par notre instrument. La désulfatation du 4-MUS par HSulf-2 est donc une réaction que nous pouvons suivre en continu par fluorimétrie dans nos conditions.

Cependant, la variation d'intensité du signal de fluorescence est trop faible pour que l'on puisse calculer la quantité de 4-MU formé.

La faible intensité de fluorescence observée nous a fait nous interroger sur un possible quenching. Le tampon et les conditions étant hors d'état de cause car utilisés pour la gamme étalon de 4-MU, nous nous sommes tournés vers le principal élément différenciant HSulf-2 et la sulfatase d'*Helix pomatia* : le GAG, chaîne de 24,7 kDa de chondroïtine sulfate.

Afin de vérifier si cette chondroïtine atténue la fluorescence du 4-MU, nous avons mesuré la fluorescence du 4-MU en présence de chondroïtine sulfate B.

Nous avons observé une diminution de l'intensité de fluorescence de l'ordre de 1 à 3% en présence de CS, indiquant donc que la chondroïtine sulfate n'influence pas la fluorescence du 4-MU. La très faible activité arylsulfatase mesurée suggère donc que HSulf-2 est intrinsèquement peu active sur le substrat aryle, en accord avec la littérature qui montre une activité de formation de 4-MU de 0.001 mmole/mg d'enzyme.<sup>2</sup> Cette activité est donc bien présente mais reste très faible. Une seconde hypothèse serait que la chaîne de GAG présente sur HSulf-2 ait une influence sur son activité enzymatique.

### 9.3 Influence de la chaîne de GAG sur l'activité de HSulf-2

Pour évaluer le rôle du GAG dans l'activité ARS, nous avons supprimé le GAG de HSulf-2 à l'aide de la chondroïtinase ABC qui est l'enzyme la plus efficace pour digérer le GAG de HSulf-2. Nous appellerons cette version HSulf-2  $\Delta$ GAG et nous pourrions la comparer avec la forme native portant le GAG issue du même lot de production d'enzyme.

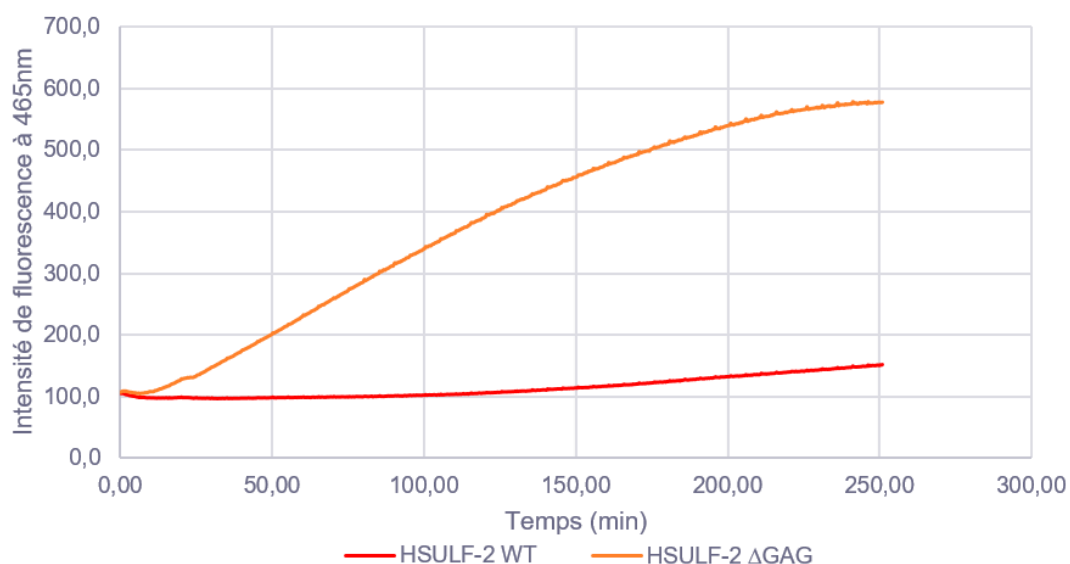


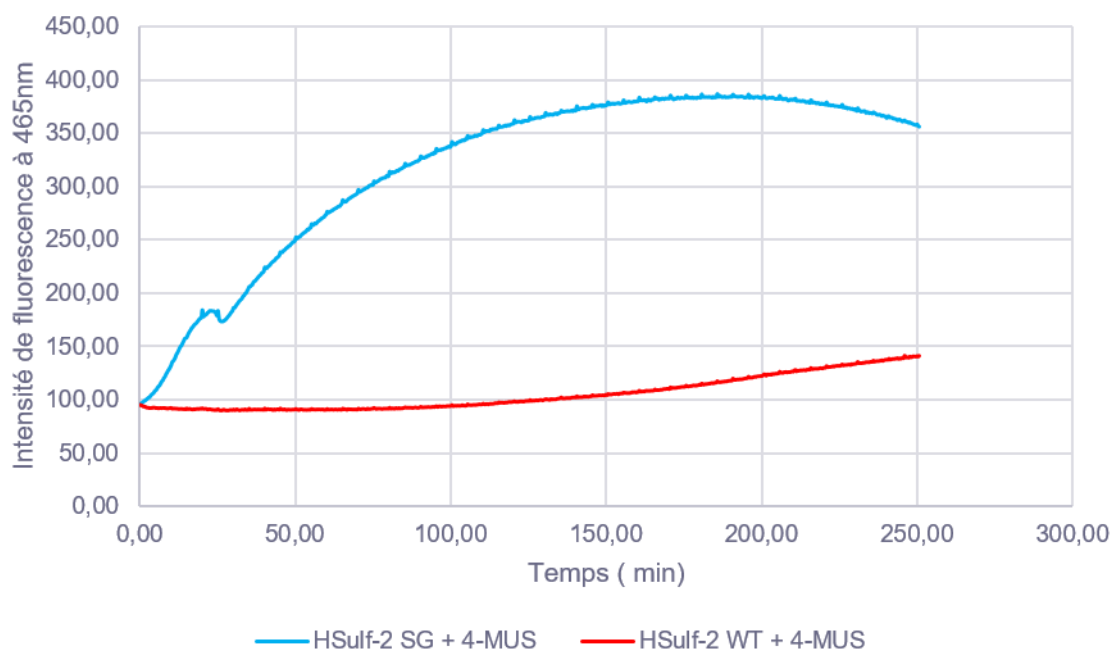
Figure 37 : Cinétique de désulfatation du 4-MUS par HSulf-2 et HSulf-2 déglycosylé

2  $\mu$ g de HSulf-2 WT ou HSulf-2 $\Delta$ GAG sont ajoutés à du 4-MUS 20 mM dans un tampon Tris 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, pH 7,5. La réaction a lieu directement sur la plaque 96 puits et est suivie 4h à 37°C. Un point de mesure toutes les 20 s. HSulf-2 $\Delta$ GAG : 2  $\mu$ g de HSulf-2 dont le GAG ont été préalablement digérés par 5  $\mu$ L de CSase ABC 10 mU pendant une nuit à 37°C dans un tampon Tris 20 mM pH 7,2. (Résultat d'une seule mesure)

Cette mesure au cours du temps (Fig 37) montre que HSulf-2 a une plus grande activité en absence de GAG. En effet, la variation d'intensité de fluorescence est significative et nous permet de calculer, grâce à une gamme de concentration établie préalablement, qu'environ 10 amole de 4-MU ont été formées en 4 h de réaction. Ce résultat indique que le GAG de HSulf-2 a une fonction de régulation de l'activité ARS de l'enzyme. Sachant qu'il existe une faible proportion de HSulf-2 sans GAG dans la préparation de l'enzyme, il est possible que l'activité observée pour la forme native avec le GAG (WT) soit due en réalité à cette faible proportion d'enzyme sans GAG. Dans ce cas, le GAG pourrait inhiber entièrement l'activité de la protéine.

L'influence du GAG sur l'activité de HSulf-2 a été confirmée en comparant l'activité de HSulf-2 WT avec celle de son mutant SG. Le mutant SG est une version de HSulf-2 avec la substitution de la sérine du motif SG par un résidu d'alanine, ne permettant donc pas le greffage du linker de la chaîne de GAG. Le mutant  $\Delta$ SG est donc dépourvu de GAG.

Nous avons donc comparé l'activité de HSulf-2 WT et de ce mutant HSulf-2  $\Delta$ SG (Fig 38). Dans ces analyses, les mesures ont été effectuées à des concentrations comparables pour les deux formes de sulfatase.



**Figure 38 : Cinétique de désulfatation du 4-MUS par HSulf-2 WT et SG**

2  $\mu$ g de HSulf-2 WT ou HSulf-2 $\Delta$ SG sont ajoutés à du 4-MUS 20 mM dans un tampon Tris 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, pH 7,5. La réaction a lieu directement sur la plaque 96 puits et est suivie 4h à 37°C. Un point de mesure toutes les 20 s. (Résultat d'une seule mesure)

Compte tenu de la différence importante d'intensité de fluorescence entre HSulf-2 WT et le mutant dépourvu de GAG, on peut confirmer que le GAG a une influence sur l'activité ARS de l'enzyme. L'activité d'HSulf-2  $\Delta$ GAG est ici supérieure à celle du mutant HSulf-2  $\Delta$ SG de 50%. Cette différence pourrait indiquer une activité spécifique inférieure de la forme mutante. Pour la suite des expériences, on préférera donc utiliser HSulf-2  $\Delta$ GAG.

Nous avons effectué une mesure de la stabilité de la fluorescence du 4-MU sur 4 h afin d'expliquer la décroissance mesurée en fin de cinétique n'avait pas d'autre origine. Cette expérience nous a permis de constater que l'intensité de fluorescence du 4-MU diminue au cours du temps. Il semblerait donc que la molécule ne soit pas complètement stable ce qui expliquerait la légère décroissance observée en fin de cinétique du mutant HSulf-2  $\Delta$ SG.

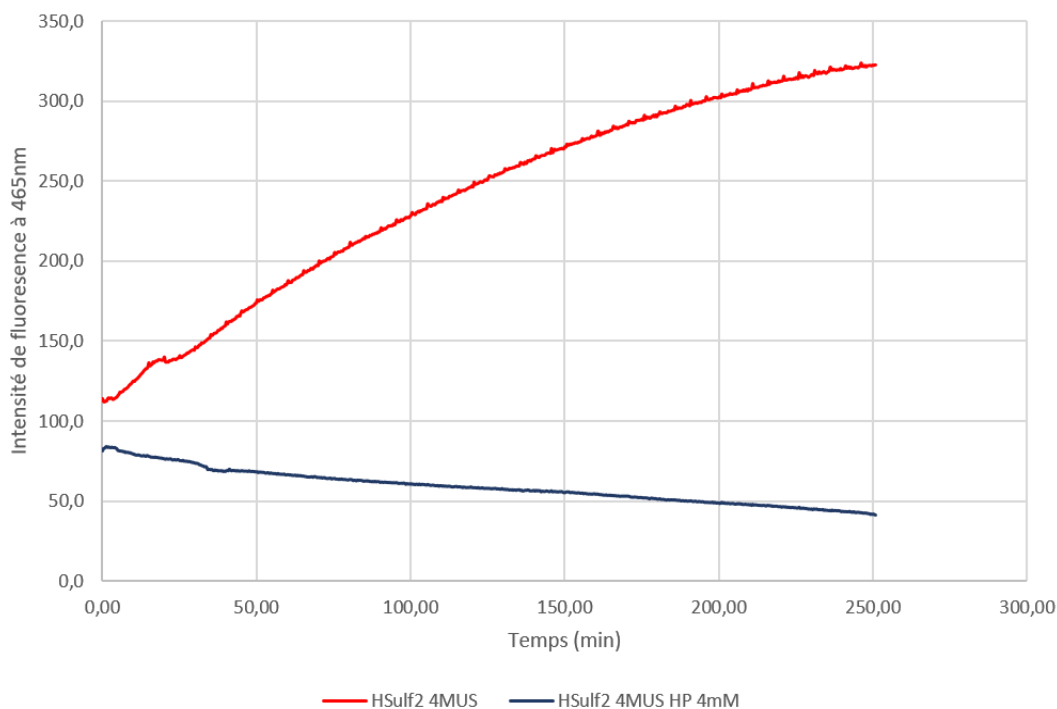
De ces expériences avec substrat synthétique, nous tirons la conclusion que l'activité ARS de HSulf-2 est peut-être régulée par son GAG. Cependant, il serait bien plus informatif de suivre la réaction enzymatique sur substrat naturel. Nous avons déjà mis en avant les difficultés à réaliser une telle mesure en direct. Nous nous sommes donc tournés vers une méthode indirecte pour évaluer l'impact du GAG sur la désulfatation enzymatique du substrat naturel.

#### 9.4 Essai par compétition entre 4-MUS et héparine

Nous avons mis en œuvre un test enzymatique basé sur la compétition entre le substrat polysaccharidique, ici l'héparine (HP), et le substrat synthétique 4-MUS. En effet il nous est impossible de suivre directement la désulfatation de HP, mais il nous est possible de constater la diminution de la désulfatation du 4-MUS pouvant résulter de la compétition pour le site actif d'HSulf-2 par HP.



La compétition des deux substrats pour le même site catalytique donnerait donc une diminution de la formation de 4-MU lorsque la concentration d'HP augmente.

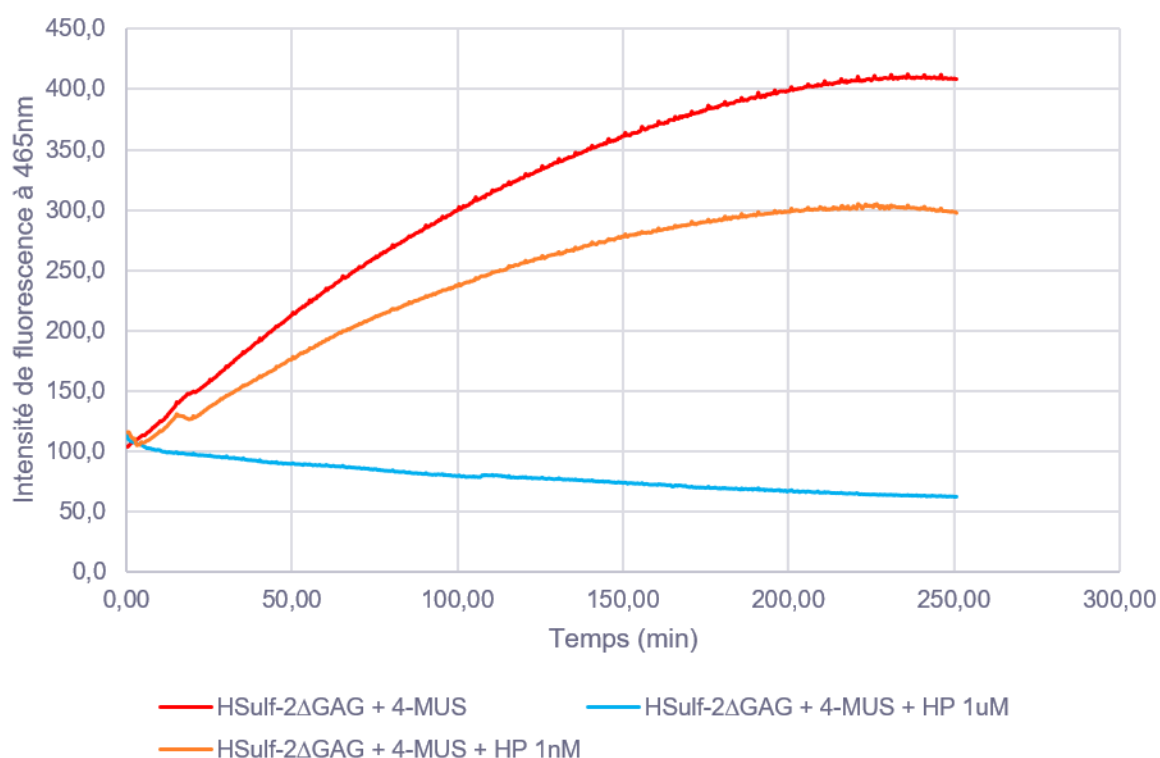


**Figure 39 : Cinétique de désulfatation du 4-MUS en présence d'heparine par HSulf-2 ΔGAG**

Courbe rouge : 2 ag de HSulf-2ΔGAG sont ajoutés à du 4-MUS 4 mM dans un tampon Tris 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM pH 7.5. La réaction a lieu directement sur la plaque 96 puits et est suivie 4 h à 37°C avec un point de mesure toutes les 20 s. Courbe bleu foncé, idem courbe rouge + heparine 16 kDa 4 mM (Résultat d'une seule mesure)

Dans des proportions équimolaires de 4-MUS et d'heparine (4 mM), nous observons une inhibition totale de la désulfatation du 4-MUS (Fig 39). On peut supposer qu'étant donné l'affinité élevée d'HSulf-2 pour son substrat polysaccharidique HP, la désulfatation du substrat synthétique est bloquée.

Le même essai a été conduit à des concentrations inférieures d'heparine à 1 μM et 1 nM sans changer la concentration de 4-MUS (4 mM) (Fig 40).



**Figure 40 : Cinétique de compétition de la désulfatation du 4-MUS et de l'héparine 1 μM/1 nM par HSulf-2**

Courbe rouge : 2 μg de HSulf-2ΔGAG sont ajoutés à du 4-MUS 4 mM dans un tampon Tris 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM pH 7.5. La réaction a lieu directement sur la plaque 96 puits et est suivie 4 h à 37°C avec un point de mesure toutes les 20 s. Courbe orange: idem courbe rouge + héparine 16 kDa 1 nM. Courbe bleu: idem courbe rouge + héparine 16 kDa 1 μM. (Résultat d'une seule mesure)

Nous pouvons observer une diminution progressive de la désulfatation du 4-MUS avec l'augmentation de la concentration d'héparine. Ce qui est compatible avec l'hypothèse d'une compétition au niveau du site catalytique. Il faut cependant noter qu'il n'est pas possible ici de déterminer si le substrat polysaccharidique a été désulfaté. Il faudrait donc coupler cette méthode avec une méthode analytique telle que la spectrométrie de masse pour confirmer la perte de sulfate.

A partir de cette expérience, on peut déduire que l'affinité de HSulf-2 pour l'héparine est élevée avec un ordre de grandeur compris entre le micro et le nanomolaire tandis que celle pour 4-MUS doit être bien supérieure, de l'ordre du millimolaire ce qui est en accord avec la

littérature.<sup>2</sup> Pour la déterminer précisément, il faudrait reproduire des expériences avec différentes concentrations d'héparine afin de pouvoir déterminer les paramètres cinétiques ( $K_i$ ). Par manque de matériel enzymatique nous n'avons pu aller plus loin dans cet expérience.

Dans ce chapitre, nous avons pu établir les conditions de mesure en continu de la désulfatation du 4-MUS par HSulf-2 alors que jusqu'à maintenant seules des mesures en point final avaient été rapportées.<sup>98</sup> Grâce à cette technique de mesure, nous sommes en capacité de comparer l'évolution de plusieurs cinétiques en fonction de la forme d'enzyme ou de la concentration de substrat étudiée.

Nous avons déterminé l'influence de la chaîne de GAG sur l'activité ARS de HSulf-2. En effet l'activité arylsulfatase est beaucoup plus faible avec l'enzyme portant le GAG qu'avec l'enzyme dépourvu de GAG. Cela suggèrerait un mécanisme de régulation de l'activité enzymatique par le GAG.

Pour finir, grâce à cette méthode, il serait possible de déterminer l'affinité de HSulf-2 pour différents substrats tels que de l'héparine à des degrés de polymérisations variés. Nous pourrions déterminer à partir de quelle taille d'oligosaccharide nous avons une compétition visible avec la désulfatation du 4-MUS et donc une présentation du sucre au site catalytique. Nous pourrions également déterminer l'impact de diverses modifications post-traductionnelles sur l'activité de HSulf-2 comme par exemple la *N*-glycosylation en examinant l'évolution de la réaction de désulfatation du 4-MUS après action d'une *N*-glycosydase sur HSulf-2.

## **Chapitre 5 : Discussion et perspectives**

## 10.1 Discussion et perspectives

### 10.1.1 Caractérisation de la chaîne de glycosaminoglycane portée par HSulf-2

Nous nous sommes intéressés dans un premier temps à l'identification d'une modification post-traductionnelle singulière de HSulf-2, à savoir une chaîne de glycosaminoglycane. Sur la base des travaux précédemment menés au laboratoire,<sup>96</sup> nous sommes partis du postulat que cette chaîne était constituée de chondroïtine sulfate (CS), ce que nous avons confirmé par immuno-détection en utilisant un anticorps monoclonal anti-CS.

Une fois confirmée la nature chondroïtine de ce GAG, nous avons caractérisé la structure du bras saccharidique « linker » reliant ce GAG à la protéine HSulf-2 jusqu'alors totalement inconnue. Ce « linker » a été détecté sous la forme d'un hexasaccharide de structure Xyl-(Gal)<sub>2</sub>-GlcUA-GalNAc(S)-ΔGlcUA comprenant un disaccharide insaturé de chondroïtine mono-sulfaté et un tetrasaccharide correspondant à la structure classique de linker de GAG de chondroïtine. Cette structure a été identifiée sur la sérine S559 portée par la chaîne courte de HSulf-2.

Ce résultat explique pourquoi lors de précédents travaux au laboratoire en 2015 et lors de nos expériences durant cette thèse, il était impossible de détecter la chaîne courte de la protéine sur SDS-PAGE, <sup>96</sup> le GAG empêchant la coloration de cette chaîne par une coloration spécifique des protéines.

Nous avons par ailleurs pu montrer que la hyaluronidase-4 était un nouvel outil pour la caractérisation des chaînes de chondroïtine puisque cette enzyme digère les CS-A et CS-C en créant des oligosaccharides de tailles variées analysables par diverses techniques : spectrométrie de masse, chromatographie, RMN. Appliquée à HSulf-2, cette enzyme nous a permis d'obtenir des oligosaccharides saturés analysables par RMN. Ces analyses RMN

mettent en évidence la présence de CS-B dans la chaîne de chondroïtine de HSulf-2. Ces résultats sont en accord avec les travaux du Dr Seffouh.<sup>196</sup> qui avait montré par gel d'électrophorèse C-PAGE une digestion de la chaîne de GAG de HSulf-2 par une chondroïtinase spécifique de CS-B.

Il faut également noter que notre choix s'est tourné vers la hyaluronidase-4 car c'est une hydrolase du milieu extracellulaire, ce qui fait d'elle un partenaire d'interactions possible pour HSulf-2 *in-vivo*.<sup>146</sup>

Nous avons conclu de cette étude que, la modification post-traductionnelle de HSulf-2 de type chondroïtine possède une structure de protéoglycane classique avec un linker, dont la structure est comparable à celle des protéoglycanes connues dans la littérature.<sup>113</sup> Pour finir, cette structure contient différents types de chondroïtine à savoir CS-A, CS-B et CS-C.

Nous ne savons cependant pas comment ces chondroïtines sont réparties le long de la chaîne de GAG. La digestion enzymatique du GAG de HSulf-2, suivie d'une séparation sur gel d'électrophorèse C-PAGE nous ont permis de voir qu'après action de la hyaluronidase-4 nous obtenons des tailles variées d'oligosaccharides. Cette enzyme ne clivant pas les CS-B, on peut supposer qu'il y a une alternance de CS-B et de CS-A/C le long de la chaîne, menant à différentes tailles d'oligosaccharides après coupure des CS-A et CS-C.

Pour confirmer cette hypothèse, il pourrait être intéressant de comparer par spectrométrie de masse les oligosaccharides obtenus après digestions du GAG de HSulf-2 par différentes chondroïtinases spécifiques des différents types de CS.

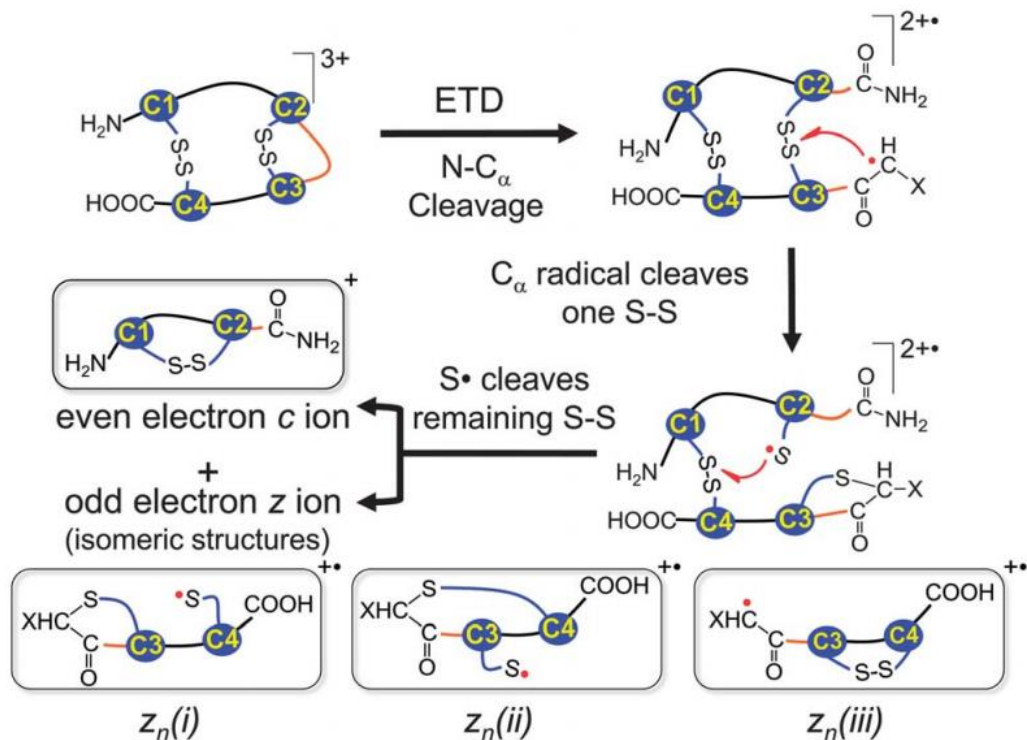
### 10.1.2 Identification des ponts disulfure de HSulf-2

Afin d'isoler et de détecter des peptides reliés par un pont disulfure, nous avons procédé à des expériences de fragmentation MS/MS ciblant la liaison disulfure et les squelettes peptidiques. Une telle fragmentation des peptides reliés par des ponts disulfure n'est pas toujours satisfaite dans des conditions d'analyses MS/MS utilisant la dissociation induite par collision à basse énergie (CID).<sup>147</sup> Des informations de séquence riches peuvent être obtenues après réduction et alkylation des cystéines impliquées dans les liaisons disulfure avant l'analyse MS,<sup>148</sup> mais au prix de la perte d'informations sur le motif de la liaison disulfure. Des stratégies alternatives ont donc été développées pour cliver les liaisons disulfure en phase gazeuse, en particulier celle basées sur la fragmentation ETD, qui est de plus en plus utilisée pour la caractérisation de peptides ou de protéines liées par des ponts disulfure. Des clivages faciles des liaisons disulfure et une bonne identification des chaînes reliées par ces ponts ont été rapportées pour cette méthode de fragmentation.<sup>149-153</sup>

Concernant l'analyse de HSulf-2, la fragmentation ETD a permis d'identifier 10 résidus cystéine impliqués dans des ponts disulfure. Ces cystéines C89, C422, C431, C440, C453, C480, C482, C636, C638 et C798 sont réparties sur les deux chaînes avec une forte présence dans le domaine HD. Cependant pour les cystéines très proches dans le domaine HD, il est difficile d'affirmer quelles cystéines sont reliées entre elles. Une ambiguïté subsiste donc sur la structure des ponts impliquant les cystéines C422, C431, C440, C453 et C798.

Cependant, bien qu'étant une technique de choix pour l'analyse des ponts disulfure, l'ETD met en jeu des mécanismes de fragmentation parfois compliqués et l'identification des ponts disulfure n'est pas toujours univoque. Ainsi, dans les résultats que nous avons reportés dans ce manuscrit, un même résidu cystéine semble établir des ponts disulfure avec plusieurs

autres. Par exemple la cystéine C422 peut être reliée à la C431 ou la C440. Ceci est dû au mécanisme décrit Fig 41. <sup>154</sup>



**Figure 41: Fragmentation ETD des ponts disulfure**

**Mécanisme proposé pour la formation d'ion c et z $^\circ$  cycliques à partir d'une région du squelette protéique recouvrant deux ponts disulfure. Plusieurs structures isomères Z $_n$ (i,ii,iii) sont possibles pour les ions z. (D'après Lei Tan et al) <sup>154</sup>**

Ce mécanisme en cascade peut conduire à ce que des ponts disulfure se forment au cours de l'analyse ETD entre des cystéines qui n'étaient pas initialement reliées, si ces dernières sont spatialement proches.

Malgré ces incertitudes, ces données sont une source d'information importante sur le repliement de la protéine. Les cystéines C89 et C798, très distantes dans la séquence primaire, ont été identifiées comme reliées par un pont disulfure. Ce qui nous indique un repliement de la protéine. Ce repliement induit un rapprochement des cystéines C431 et C798 qui sont éloignées dans la séquence peptidique mais semblent être touchées par le mécanisme en cascade

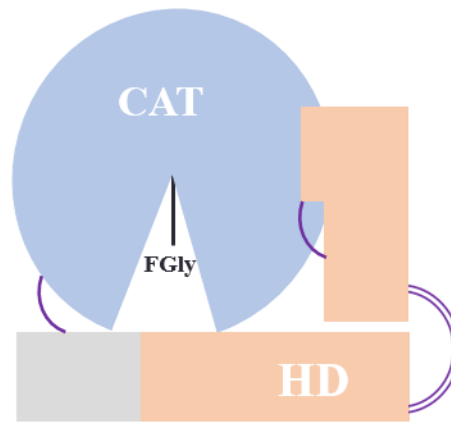


puisque nous avons détecté la présence de ponts entre ces deux cystéines. Cela indiquerait donc que dans la structure 3D de la protéine ces deux résidus ne sont pas éloignés et donc renforcerait l'hypothèse de repliement de la protéine pour positionner le domaine HD proche du site catalytique (Fig 42). Ce résultats est en accord avec le modèle de HSulf-2, avec un repliement des deux chaînes, sous une forme de pince pouvant accueillir le substrat en son milieu.<sup>155</sup>

Pour conforter et préciser plus encore le schéma de ponts disulfure, nous pourrions par exemple explorer d'autres modes de fragmentation. On peut citer par exemple l'ECD<sup>156,157</sup> ou encore l'UV-Photodissociation<sup>158</sup> qui sont également utilisées pour l'étude des ponts disulfure et dont les mécanismes de fragmentation pourraient être plus équivoque.

Les ponts disulfure observés dans le domaine HD de HSulf-2 ont également été identifiés sur le domaine HD isolé produit en système bactérien. Du fait de l'expression du domaine HD isolé dans un système bactérien, nous pouvons penser que la formation des ponts disulfure chez HSulf-2 n'est pas dépendante d'une catalyse enzymatique par des enzymes présentes dans le système eucaryote. On peut donc supposer que la formation des ponts disulfure est orientée de façon spontanée par la séquence proteique.<sup>140</sup>

Différents types de liaisons disulfure ont été identifiés dans HSulf-2. Des liaisons disulfure interchaîne dans le domaine HD, qui semblent montrer un besoin important de repliement dans le domaine d'interaction, mais aussi une liaison hors du domaine HD entre Cys89 très proche du site catalytique et Cys798 qui doit être essentielle pour la structure 3D de la protéine (Fig 42 et Fig 43).



**Figure 42: Hypothèse de repliement 3D de HSulf-2**

En orange le domaine hydrophile, en bleu le domaine catalytique, en gris le domaine C-terminal et en violet les ponts disulfure

Le repliement tel qu'illustré Fig 42 permettrait au domaine HD responsable de l'interaction avec le substrat de le rapprocher du site catalytique.

En 2021 un logiciel d'intelligence artificielle appelé AlphaFold a été développé permettant de prédire la structure de protéines à partir de leur séquence primaire et à l'aide des données recueillies dans des bases de données telle que la PDB.<sup>159</sup> Ce logiciel a été utilisé pour analyser la structure de HSulf-2 cependant, en raison de sa structure unique parmi les sulfatases connues et de ses modifications post-traductionnelles, il n'est pas possible d'obtenir une prédiction avec des scores de confiance élevés sur l'entièreté de la protéine. Ces résultats de prédictions sont toutefois indicatifs pour certaines régions de la protéine. On retrouve les cystéines C422 et C440 reliées par un pont disulfure mais également les cystéines C431 et C453. Ces deux ponts sont prédits avec des scores de confiance de plus de 80 ce qui indique une forte probabilité, en accord avec l'hypothèse de repliement dans le domaine HD.

Par ailleurs, sur 23 cystéines présentes dans la séquence peptidique de HSulf-2, 22 sont conservées dans la séquence de HSulf-1. Les informations obtenues sur la structure des ponts

disulfure de HSulf-2 devraient donc faciliter les études structure de la 6-O-endosulfatases HSulf-1.

### 10.1.3 *N*-glycosylation de HSulf-2

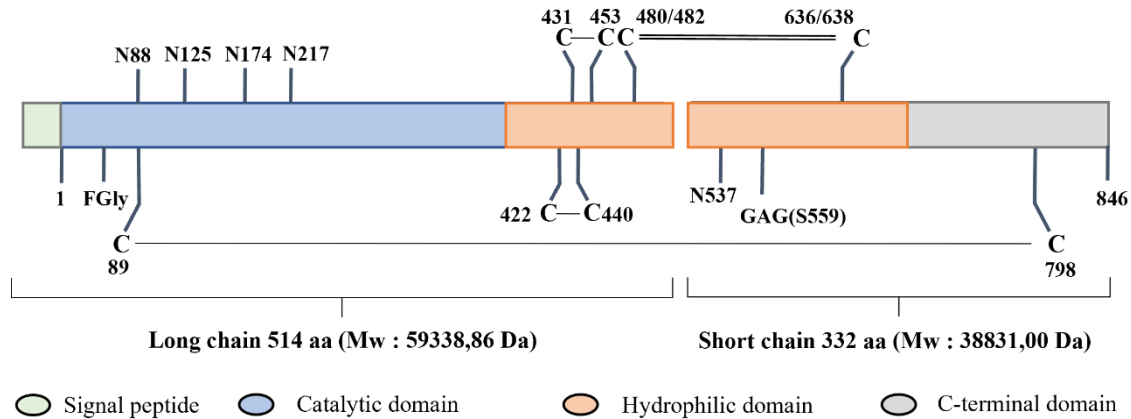
#### 10.1.3.1 Structures et positions des *N*-glycanes

Pour la première fois, nous avons pu déterminer avec certitude la localisation de cinq *N*-glycanes en position N88, N125, N174, N217 et N537 et déterminer la structure majoritaire de chacun d'eux. Ces cinq positions avait été prédites en 2019 par I. Seffouh comme des sites potentiels de *N*-glycosylation.<sup>94</sup>

Cependant nous n'avons pas été en possibilité de caractériser tous les sites potentiels de *N*-glycosylation en raison des lacunes de couverture de séquence, malgré les tentatives répétées et l'utilisation de différentes protéases. Cela peut être dû au mode d'acquisition data dépendant (DDA) que nous avons utilisé durant nos analyses et qui ne sélectionne que les ions les plus intenses du spectre MS. Nos analyses ont montré qu'il pourrait y avoir un sixième site de *N*-glycosylation. Il pourrait être intéressant de répéter ces analyses en mode d'acquisition indépendant (DIA) afin d'observer un maximum d'ions de HSulf-2. De plus, nous pourrions les effectuer sur un spectromètre de masse plus récent afin de profiter des avancées technologiques en terme de sensibilité, certains constructeurs annonçant à ce jour des couvertures de séquence de plus de 90% sur des protéines isolées.

Le rôle des *N*-glycanes reste encore à déterminer mais plusieurs hypothèses peuvent être émises de par leur position le long de la chaîne protéique (Fig 43). Les quatre premiers sites, localisés dans le domaine catalytique, pourraient avoir un rôle dans l'orientation du substrat. Le cinquième, localisé dans le domaine HD, pourrait jouer un rôle dans l'interaction avec le

substrat mais aussi dans le processus de maturation de la protéine car proche d'un site potentiel de coupure par la furine.



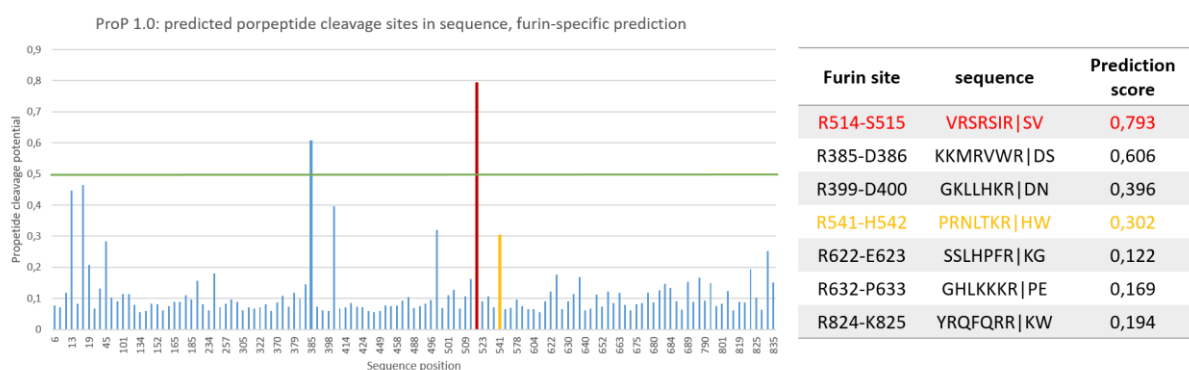
**Figure 43 : Schéma représentant la répartition des modifications post-traductionnelles identifiées sur HSulf-2, ponts disulfure, N-glycanes et GAG**

### 10.1.3.2 Rôle de la N-glycosylation dans la maturation des protéines

HSulf-2 est produite par la cellule sous la forme d'une pro-enzyme monocaténaire qui est ensuite clivée en deux chaînes par la furine pour conduire à l'enzyme mature. La furine est une protéase impliquée dans la maturation de nombreuses protéines. On la retrouve notamment dans le processus de maturation de la protéine Spike, protéine de la capsid du virus SARS-CoV-2 responsable de l'épidémie de COVID-19.<sup>160</sup> La furine agit sur la séquence consensus R-X-(R/K/X)-R2.<sup>161</sup>

Il est admis dans la littérature que HSulf-2 ne présente qu'un seul site clivé par la furine, le site R514. Néanmoins si l'on considère les séquences consensus théoriques de coupure, il existe de nombreux sites avec des probabilités variables de coupure. Le logiciel ProP 1.0 s'appuie sur les séquences consensus connues dans la littérature pour évaluer la probabilité

d'une coupure par la furine sur une séquence donnée. La prédiction de ces sites de coupure pour HSulf-2 est présentée Fig 44.



**Figure 44 : Prédiction des sites de coupures théoriques à la furine sur la séquence de HSulf-2 par ProP 1.0**

La prédiction par ProP indique la R514 comme étant le site avec la probabilité de coupure la plus élevée, ce qui est en accord avec la littérature et les expériences. Cependant un autre site a retenu notre attention, le site R541 situé à proximité d'un *N*-glycane complexe sur le résidu N537 (Fig 44). En effet nous ne connaissons pas, à ce jour, l'influence des *N*-glycans sur la coupure à la furine. On peut donc se demander si la présence du *N*-glycane protège ou régule la coupure à ce site. Ce site se situe sur la chaîne courte de la protéine et engendrerait, s'il était clivé, un petit peptide de 27 acides aminés. On peut aussi supposer que si ce site était clivé il n'y aurait pas de coupure au site principal qui est le R514. Pour tester ces hypothèses, il serait possible d'étudier l'activité de la furine sur HSulf-2 WT et sur HSulf-2 après action d'une *N*-glycosylase.

Par ailleurs, cette hypothèse de sites variables de coupure par la furine est soutenue par l'aspect du spectre MALDI-TOF Fig 31.A de HSulf-2ΔGAG en conditions réductrices. On peut voir des épaulements sur le pic correspondant à la chaîne courte. Ces épaulements

correspondent peut-être à des coupures minoritaires par la furine sur d'autres sites, mais nous aurions besoin d'une résolution plus élevée pour conclure sur ce point.

#### 10.1.4 Mesure de l'activité sulfatase et arylsulfase en mesure continue

Nous avons enfin pu établir les conditions d'un suivi continu de la désulfatation du 4-MUS par HSulf-2. Depuis 2006, seuls des suivis non continus ont été effectués pour mesurer l'activité de HSulf-2. Dans ce travail, l'analyse en suivi continu nous a permis de mesurer l'influence de la chaîne de GAG sur son activité. Nous avons observé que HSulf-2 WT présente une plus faible activité arylsulfatase sur le 4-MUS que HSulf-2  $\Delta$ GAG. On peut en conclure que le GAG régule l'activité sulfatase de HSulf-2 même si le mécanisme reste non élucidé. Le GAG pourrait par exemple limiter l'accès au site catalytique, diminuant ainsi l'activité enzymatique. Cette limitation pourrait être levée, par une hydrolase extracellulaire comme la Hyal-4, capable de digérer le GAG et augmenter l'activité de HSulf-2 lorsque cela est nécessaire.

Nous avons aussi pu observer l'effet de l'héparine sur la désulfatation du 4-MUS. En effet, plus la concentration d'héparine est élevée, moins on observe de désulfatation du 4-MUS. On peut donc supposer qu'il y a compétition entre l'héparine et le 4-MUS au niveau du site catalytique de HSulf-2 puisque les deux composés sont substrats de l'enzyme. Il faudrait déterminer à partir de quelle taille un oligosaccharide entre en compétition avec la désulfatation du 4-MUS et donc à partir de quelle taille se développe l'activité endosulfatase.

Pour aller plus loin dans la compréhension de cette activité enzymatique, il pourrait être intéressant de mener ces expériences de compétition en examinant l'influence des différentes MPTs de HSulf-2 sur son activité. Nous pourrions aussi évaluer l'influence de la N-

glycosylation en mesurant l'activité après action d'une *N*-glycosidase ou encore l'influence des ponts disulfures en suivant l'activité après réduction et alkylation.

Enfin, nous avons récemment commencé à développer une méthode de suivi de l'activité enzymatique de HSulf-2 sur des petits substrats naturels tels que des DP6 d'héparane sulfate. Cette méthode repose sur le couplage de la chromatographie liquide d'interaction hydrophile (HILIC) à la spectrométrie de masse. Il serait ainsi possible de faire des prélèvements réguliers pour observer l'état de sulfatation du substrat par chromatographie HILIC et donc suivre sa désulfatation au cours du temps.

#### 10.1.5 Détermination de la structure tridimensionnelle

L'hypothèse du repliement de la protéine grâce aux informations nouvelles sur ses ponts disulfure pourrait également être alimentée en croisant ces résultats avec une cartographie de la surface accessible au solvant par marquage oxydant (synchrotron Soleil) couplé à la spectrométrie de masse.<sup>162</sup> En effet, il est possible par ce procédé de cartographier spécifiquement les résidus exposés au solvant et d'en déduire les domaines qui par repliement ou par interaction sont protégés du marquage.<sup>162,163</sup>

Cela nous permettrait de comparer les surfaces accessibles au solvant de la protéine avec et sans GAG mais également en présence et en absence de son substrat afin de mieux comprendre les interactions et mécanismes mis en jeu.

Une autre stratégie envisageable serait la spectrométrie de masse par échange hydrogène/deutérium le HDX-MS. Les échanges hydrogène/deutérium sont utilisés pour étudier la structure des protéines et leurs interactions avec différents ligands.<sup>164</sup> Les protéines sont diluées dans de l'eau lourde (D<sub>2</sub>O) et les hydrogènes labiles des acides aminés accessibles

sont échangés par des atomes de deutérium. On obtient ainsi des informations sur la conformation de la protéine.<sup>165-167</sup>

Pour finir, il serait sans doute très instructif de faire une comparaison avec HSulf-1, qui présente de grandes ressemblances mais également des différences avec HSulf-2 que ce soit d'un point de vue biologique ou structural. En effet, nous savons que les domaines HD de HSulf-1 et 2 ne présentent que 45% d'homologie de séquence,<sup>21</sup> de plus HSulf-2 est la seule des deux enzymes portant un GAG.<sup>168</sup> Comparer leur structure dans différentes situations, par exemple en présence et en absence de substrat, nous permettrait peut-être de mieux comprendre les spécificités de ces deux enzymes et d'orienter la recherche d'inhibiteurs spécifiques.

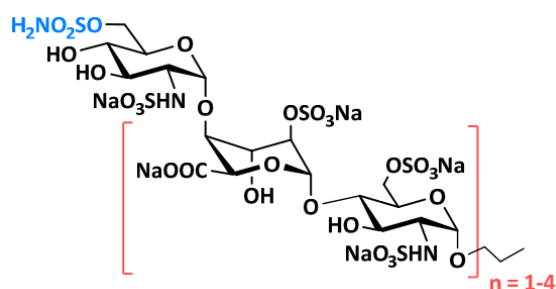
#### 10.1.6 Vers des inhibiteurs spécifiques des endosulfatases

Un des objectifs à long terme de ce projet de caractérisation des endosulfatases humaines HSulf-1 et HSulf-2 est la conception d'inhibiteurs spécifiques qui pourraient prendre place dans la lutte contre le cancer et les nombreuses pathologies associées à ces sulfatases.

Afin d'obtenir des inhibiteurs spécifiques, deux niveaux de spécificité sont à différencier. Le premier est d'obtenir un inhibiteur spécifique des endosulfatases par opposition aux arylsulfatases. Le deuxième est d'obtenir un inhibiteur qui parmi les endosulfatases serait spécifique uniquement de HSulf-1 ou HSulf-2.

Une étude de 2020 a utilisé différentes tailles de mimes d'héparane sulfate fonctionnalisés pour l'inhibition de l'activité de HSulf-2 avec des fonctions sulfamates. Les auteurs ont montré que jusqu'à 72% de l'activité arylsulfatase était inhibée avec un nonasaccharide (Fig 45).<sup>169</sup>





**Figure 45 : Fragment d'héparane sulfate fonctionnalisé pour l'inhibition de HSulf-2 (d'après P. Quellier) <sup>169</sup>**

En couplant l'utilisation d'inhibiteurs avec la mesure d'activité de HSulf-2 sur le 4-MUS en suivi continu que nous avons mis au point, il serait également possible d'observer l'efficacité d'inhibition de HSulf-2. Il faudrait tester les inhibiteurs sur HSulf-2 WT et HSulf-2  $\Delta$ GAG afin de s'assurer de l'efficacité de l'inhibiteur sur la forme la plus active. Le même protocole de suivi continu sur HSulf-1 nous permettrait également de comparer l'effet d'un même inhibiteur sur les deux formes HSulf-1 et HSulf-2 et ainsi de vérifier la spécificité de l'inhibiteur choisi.

## **Chapitre 6 : Matériels et méthodes**

## 11.1 Matériels

### 11.1.1 Solvants et tampons

- Acétonitrile,  $\geq 99,9\%$ , référence.34967, Sigma-Aldrich.
- Acide acétique,  $\geq 99,7\%$ , référence.320099, Sigma-Aldrich.
- Acide chlorhydrique,  $\geq 37\%$ , référence.258148, Sigma-Aldrich.
- Acide sinapinique,  $\geq 99\%$ , référence. 2084873, Fluka
- Acide trifluoroacétique,  $\geq 99,5\%$ , référence.73645, Fluka.
- Bicarbonate d'ammonium, référence.A6141, Sigma-Aldrich.
- Eau ultra-pure Milli-Q, Millipore.
- Ethanol,  $\geq 99\%$ , référence.20821, VWR.
- Formaldéhyde,  $\geq 36\%$ , référence.47608, Sigma-Aldrich.
- Glycérol,  $\geq 99,5\%$ , référence.453752, Carlo-Erba.
- Sodium dodecyl Sulfate (SDS), référence.71736, Sigma-Aldrich.
- Tampon phosphate salin (PBS), référence.P4417, Sigma-Aldrich.
- Tampon tris-salin 0.1% Tween 20 (TBST), référence.91414, Sigma-Aldrich.
- Trizma hydrochloride, référence.T3253, Sigma-Aldrich.

### 11.1.2 Réactifs

- Acrylamide/bis-acrylamide 29/1 (40%; w/v), référence.A515.1, Roth.

- Bleu alcian 8GX, référence.A9186, Sigma-Aldrich.
- Carbonate de sodium, référence.S7795, Sigma-Aldrich.
- Chlorure de calcium, référence.C5670, Sigma-Aldrich.
- Chlorure de sodium, référence.S9625, Sigma-Aldrich.
- DL-Dithiothreitol (DTT), référence.D9779, Sigma-Aldrich.
- InstantBlue™ Protein Stain, référence.ISB 1L, Expedeon, Cambridgeshire, UK.
- Iodoacétamide (IAA), référence.16125, Sigma-Aldrich.
- Nitrate d'argent, >99%, référence.58157, Sigma-Aldrich.
- N,N,N,N-Tetraméthyléthylènediamine (Temed), référence.T8133, Sigma-Aldrich.
- Polyvinyle d'alcool (PVA), référence.341584, Sigma-Aldrich.
- Rouge ponceau, référence.P7170, Sigma-Aldrich.
- 4-vinylpyridine, ≥95%, référence.V3877, Sigma-Aldrich.

### 11.1.3 Oligosaccharides et polysaccharides

- Chondroïtine sulfate (CS-A), référence.C8529, Sigma-Aldrich.
- Chondroïtine sulfate (CS-B), référence.C3788, Sigma-Aldrich.
- Chondroïtine sulfate (CS-C), référence.C4384, Sigma-Aldrich.
- Disaccharide  $\Delta$ UA-GalNac,4S référence.CS002, Iduron

$\Delta$ UA-GalNac,6S référence.CS003, Iduron

- Tetrasaccharide  $\Delta$ UA-(GalNac,6S / 4S-GlcA)n-GalNac,6S / 4S référence.CS004,

Iduron

$\Delta$ HexA-GalNac,4S -(IdoA-GalNac,4S)n référence.DS004, Iduron

#### 11.1.4 Anticorps

- Anticorps primaire Anti-Chondroïtine sulfate CS-56, référence.C8035, Sigma-Aldrich

- Anticorps secondaire Anti-IGg de souris, référence.7076S, Cell signaling

#### 11.1.5 Enzymes

- **PNGase F**,  $\geq 10,000$  U/mL, Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 50 mM, EDTA 5 mM, (référence.V483A, Promega).

- **Actinase E**,  $\geq 4$  U/mg, la poudre est solubilisée dans l'eau 5 mg/mL (référence.P6911, Sigma-Aldrich).

- **Chondroïtinase AC**, référence.E2039, Sigma-Aldrich. Poudre solubilisée dans 100  $\mu$ L H<sub>2</sub>O, reconstituant le tampon final phosphate de potassium 25 mM, pH 6,5, NaCl 150 mM; activité 0,1 U/ $\mu$ L.

- **Chondroïtinase B**, référence.CSB-ENZ, Iduron. 1 U dans 5  $\mu$ L acétate de sodium 0,1 M pH 7, acétate de calcium 0,1 mM, 0.1% BSA; diluée par 45  $\mu$ L acétate de sodium 0,1 M pH 7, acétate de calcium 0, 1 mM, activité finale 0,02 U/ $\mu$ L.

- **Chondroïtinase ABC**, 0,2% BSA, référence.C2905, Sigma-Aldrich. Poudre solubilisée dans Tris-HCl 20 mM, pH 7,2 (20 mU/μL); aliquotée à 2 mU/μL dans Tris-HCl 2 mM, pH 7,2, 0,01% BSA.

- **ASP-N**, 2 μg solubilisés dans 50 μL H<sub>2</sub>O (0,04 μg/μl) reconstituant le tampon final Tris-HCl 10 mM (pH 8,0), (référence.V162A, Promega).

-**Trypsine**, 20 μg resolubilisés dans 100 μL de « resuspension Buffer » (0,2 μg/μL) reconstituant le tampon final, Tris-HCl 10 mM (pH 8,0) (référence.V5111, Promega).

-**Hyaluronidase**, Recombinant humain HYAL-4, 20 μg solubilisés dans Tris 12.5 mM, NaCl 75 mM et 50% (v/v) glycerol, pH 7.5 à une concentration de 1.060 mg/mL. (référence.6904-GH-020, bio-technie)

- **Chymotrypsine**, 25 μg resolubilisés dans 50 μL de HCl 1 mM (0,5 μg/μL). (référence.V106A, Promega).

- **Furine**, furin human ≥ 2,000 U/mL solubilisés dans un tampon MES 10 mM, pH 7, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, 50% glycerol.

#### 11.1.6 HSulf-2 et Domaine HD

Le domaine isolé HD et l'enzyme HSulf-2 sous sa forme sauvage (WT) et mutante (SG) ont été obtenus grâce à une collaboration avec le Dr. Romain Vivès (Laboratoire Structure et Activité des Glycosaminoglycanes à l'Institut de Biologie Structurale, Grenoble). Ces protéines sont dans un tampon Tris-HCl 50 mM, NaCl 300 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, 20% glycérol, pH 7,5 et conservés à -80°C. Leurs concentrations sont déterminées par mesure de l'absorbance à 280 nm (NanoDrop, Thermo Scientific,  $\epsilon = 166660 \text{ L.mole}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ).

### 11.1.7 Instruments

#### **NanoESI-LTQ-Orbitrap**

Les analyses NanoLC-ESI-MS/MS sont effectuées sur un système de chromatographie Ultimate 3000 (Dionex) couplé à un spectromètre de masse LTQ-Orbitrap™ XL (Thermo Scientific, San Jose, CA) équipé d'une source nanospray. Le capillaire de nébulisation (tip emitter) utilisé est en silice, avec une extrémité en verre (Pico-tip, FS360-50-15-CE-20-C10.5, New Objective, Woburn, MA, USA).

#### **RMN**

Les spectres RMN ont été obtenus à 303K sur un spectromètre AVIII HD 600MHz Bruker équipé d'une cryosonde à triple résonance.

#### **MALDI-TOF**

Les spectres MALDI-TOF ont été obtenus sur un MALDI-TOF/TOF UltrafleXtreme Bruker

#### **SPECTROPHOTOMETRE**

Les mesures d'activité enzymatique ont été réalisées sur un spectrophotometre Varioskan™ LUX Thermo Scientific Cat.No. N16700 Rev 1.2 2016

## 11.2 Méthodes

### 11.2.1 Électrophorèse des protéines sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)

Principe de l'électrophorèse discontinue sur gel selon Laemmli<sup>170</sup>

- ◁ Préparation du gel

Les gels (7,3 × 8,3 × 0,1 cm ; hauteur × largeur × épaisseur) sont préparés en utilisant le système Mini Protean 3 (Biorad). La préparation pour deux gels comprend:

Gel de concentration (staging)  
5% d'acrylamide

| Composé                               | Volume |
|---------------------------------------|--------|
| Eau                                   | 2 mL   |
| Acrylamide/Bis-acrylamide (29 :1) 40% | 650 aL |
| Tris 0,5 M pH 6,8                     | 2 mL   |
| SDS 10%                               | 100 aL |
| APS                                   | 50 aL  |
| TEMED                                 | 5 aL   |

Gel de résolution (resolving)  
10% d'acrylamide

| Composé                                 | Volume |
|---|--------|
| Eau                                     | 4 mL   |
| Acrylamide / Bis-acrylamide (29 :1) 40% | 2.5 mL |
| Tris 1,5 M pH 8,8                       | 2.5 mL |
| SDS 10%                                 | 100 aL |
| APS                                     | 100 aL |
| TEMED                                   | 15 aL  |

#### ◁ Préparation des échantillons et électrophorèse

Les échantillons de HSulf-2 (3-6 µg) non traités ou après traitement par diverses enzymes (Chondroitinase (CSase), PNGase F, HYAL-4...) sont mis en solution dans le tampon Laemmli 1X (tampon Laemmli à 5X : 4 mL Tris-Cl 1,5 M pH 6,8, 10 mL glycérol, 5 mL β-mercaptoethanol, 5 g SDS et 1 mL 1% bleu de bromophénol) et chauffés à 95°C pendant 5 minutes. Les marqueurs de poids moléculaires utilisés sont 200, 150, 120, 100, 85, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20 et 15 et 10 kDa (PageRuler Unstained Protein Ladder, ThermoFisher Scientific, référence.26614).

L'électrophorèse débute à une tension de 50 V pendant 10 minutes puis à 70 V pendant 10 minutes et enfin 150 V pendant 45 minutes. Le tampon de migration est composé de Tris 25 mM, glycine 192 mM, SDS 0,1% pH 8,3.



- ◁ Coloration des protéines en gel.

Coloration au bleu de Coomassie.

Le gel est recouvert avec une solution d'*Instant Blue*<sup>TM</sup> pendant 20 minutes sous agitation douce. Il est ensuite décoloré dans l'eau sous agitation douce entre 1h et une nuit selon l'intensité de la coloration. Le gel est conservé à 4°C.

### 11.2.2 Électrophorèse des glucides sur gel de polyacrylamide (C-PAGE)

D'après un protocole de PE. Bodet <sup>171</sup>

- ◁ Préparation du gel

Les gels (7,3 × 8,3 × 0,1 cm ; hauteur × largeur × épaisseur) sont préparés en utilisant le système Mini Protean 3 (Biorad). La préparation pour deux gels comprend:

Gel de concentration (staging)  
6% d'acrylamide

| Composé                                 | Volume  |
|---|---------|
| Eau                                     | 2.36 mL |
| Acrylamide / Bis-acrylamide (29 :1) 40% | 0.6 mL  |
| Tris/HCl 100 mM pH 7,8                  | 1 mL    |
| APS                                     | 40 aL   |
| TEMED                                   | 4 aL    |

Gel de résolution (resolving)  
27% d'acrylamide

| Composé                                 | Volume  |
|---|---------|
| Eau                                     | 0.72 mL |
| Acrylamide / Bis-acrylamide (29 :1) 40% | 8.1 mL  |
| Tris 1,5 M pH 8,8                       | 3 mL    |
| APS                                     | 120 aL  |
| TEMED                                   | 12 aL   |

◁ Préparation des échantillons et conduite de l'électrophorèse C-PAGE.

3 à 6 µg de HSulf-2 traitée ou non avec l'Actinase E 20% (m/m) et/ou diverses glycosidases sont dilués dans 10% de glycérol (3-5 µL de glycérol à 50%) et 10% de rouge de phénol (1 µL). L'électrophorèse est conduite à une tension constante de 250 V pendant 45 minutes dans le tampon de migration Tris 40 mM, acide acétique 40 mM à pH 7,8.

◁ Coloration des glucides en gel C-PAGE.

Le gel est coloré par une solution de bleu Alcian à 0,5 % (m/v) dans un mélange eau/acide acétique (98:2 ; v/v) pendant 10 minutes à température ambiante sous agitation douce. Une décoloration dans l'eau est ensuite réalisée pendant une nuit sous agitation douce. Une fois les bandes visibles, le gel est recouvert d'une solution aqueuse de nitrate d'argent à 0,4% (m/v) pendant 10 minutes, à température ambiante et à l'abri de la lumière afin d'augmenter l'intensité de la coloration. Le gel est rincé 3 fois pendant 1 minute avec de l'eau pour retirer l'excès de nitrate d'argent. Les bandes sont à nouveau révélées avec une solution de carbonate de sodium à 7% (m/v) dans un mélange aqueux de formaldéhyde à 0,08 % (v/v). Cette révélation se fait à l'abri de la lumière et est stoppée une fois les bandes intensifiées, par une solution aqueuse d'acide acétique à 5% (v/v).

### 11.2.3 Western Blot

10 ag de HSulf-2 sont dénaturés par chauffage à 95°C pendant 5 minutes dans un tampon de Laemmli contenant du β-mercaptoéthanol . L'échantillon est ensuite séparé par SDS-PAGE comme précédemment décrit. Une première coloration au rouge Ponceau est effectuée pour confirmer la présence de protéines sur le gel. Cette coloration est rincée par 3 lavages de 5 minutes dans l'eau sous agitation douce.

La protéine est ensuite transférée sur une membrane de nitrocellulose de 0.45  $\mu\text{m}$  (GE healthcare NO 10600003) dans une chambre froide à 4°C. Le transfert se fait à 110 V pendant 40 minutes dans un tampon de transfert (10% electrophoresis buffer Tris 25 mM glycine 192 mM pH 8.3 Bio-rad 1610771, 20% éthanol absolu, 70% H<sub>2</sub>O). La membrane est rincée avec de l'eau ultra pure et bloquée par du polyvinyle d'alcool avant la fixation de l'anticorps primaire anti-chondroïtine sulfate (CS-56, dilution 1:1,000 Sigma Aldrich) sur la nuit à 4°C.

La membrane est ensuite lavée trois fois 5 minutes dans un tampon TBS-T avant exposition à l'anticorps secondaire anti-mouse IgG (Cell signaling 7076S) liée à la HRP (horseradish peroxidase), (dilution 1:10,000) pendant 1 h à température ambiante.

La membrane est à nouveau lavée trois fois 5 minutes dans un tampon TBS-T avant incubation avec le révélateur chimio-luminescent. La révélation se fait suivant les recommandations du fournisseur pour le Kit (Kit ECL prime Western Blotting detection reagent Amsterdam GE Healthcare).

#### 11.2.4 Chromatographie d'exclusion stérique (SEC)

Après digestion par la HYAL-4 une SEC a été réalisée sur une colonne Bio-Gel P-10 (Bio-Rad, Hercules, CA) (85 x 3,5 cm) équilibré avec du NaCl 0,25 M, et effectué à 0,35 mL/min. Les fractions ont été recueillies toutes les 10 min pendant 24 h avec un collecteur de fraction ISCO 328. L'élution a été suivie par détection UV à 210 nm avec un détecteur UV Merck L-4000 (gamme 0,01, réponse moyenne). Pour assurer l'homogénéité de la taille des oligosaccharides élués, seul le haut du pic de chaque fraction a été regroupé et lyophilisé avant de poursuivre le traitement. Les fractions séchées et isolées ont ensuite été dessalées par filtration sur gel sur une colonne Superdex 30 Increase 10/300 GL (GE Healthcare Life sciences, Vélizy-Villacoublay, France) à l'aide d'un système de chromatographie Äkta UV-900

(Amer sham, Buckinghamshire, Royaume-Uni). La colonne Superdex 30 a été équilibrée et traitée avec du NaCl 0,1 mM, à 1 mL/min, et l'élution a été contrôlée par détection UV à 214 nm. Dessalés, les oligosaccharides ont finalement été lyophilisés et conservés à -20°C jusqu'à analyse par MS.

### 11.2.5 Déglycosylation enzymatique de HSulf-2

#### ◁ Action de la Peptidyl *N*-glycosidase F (PNGaseF)

La PNGase F coupe la liaison *N*-glycopeptidique entre l'asparagine et le premier GlcNAc de la chaîne glycosidique. La *N*-déglycosylation de HSulf-2 par la PNGase F est effectuée en conditions non dénaturantes selon le protocole du fournisseur Promega pour être compatible avec l'analyse par spectrométrie de masse. 3 µg de HSulf-2 sont dilués dans un tampon bicarbonate d'ammonium 50 mM à pH 7.8 pour un volume final de 18 µL. 2 µL de PNGase F sont ajoutés avant incubation à 37°C pour la nuit.

#### ◁ Chondroïtinases

##### a) Chondroïtinase AC

La chondroïtinase AC est une enzyme qui clive les chaînes polysaccharidiques sulfatées et non sulfatées avec des liaisons (1-4) entre les hexosamines et les résidus d'acide glucuronique. Les produits oligosaccharidiques résultants sont principalement des disaccharides avec des acides uroniques insaturés. La chondroïtinase AC dégrade spécifiquement les chondroïtines sulfates A et C, mais pas la chondroïtine sulfate B.

3-6 µg d'HSulf-2 traités ou non par l'Actinase E (volume final 7 µL) sont digérés par ajout de 2 µL de CSase AC 0,2 U et 1 µL de NaCl 1,5 M, le volume final de la réaction est

ajusté à 10  $\mu$ L avec de l'eau. Après homogénéisation au Vortex et centrifugation l'incubation se fait pendant une nuit à 37°C.

#### b) Chondroïtinase B

La chondroïtinase B dégrade spécifiquement la chondroïtine B en produisant des oligosaccharides insaturés.

3-6  $\mu$ g d'HSulf-2 traités ou non par l'Actinase E (volume final 7  $\mu$ l) sont digérés par ajout de 2  $\mu$ L de CSase B 0,04 U et 1  $\mu$ L de tampon de digestion 1 M d'acétate de sodium pH 7,0 contenant 10 mM d'acétate de calcium, pour un volume final de réaction à 10  $\mu$ L. Après homogénéisation au Vortex et centrifugation l'incubation se fait pendant une nuit à 37°C.

#### c) Chondroïtinase ABC

La chondroïtinase ABC catalyse la dégradation des polysaccharides contenant des liaisons (1-4)- $\beta$ -D-hexosamine et (1-3)- $\beta$ -D-glucuronique ou (1-3)- $\alpha$ -L-iduronique en disaccharides insaturé. Elle agit sur la chondroïtine 4-sulfate, la chondroïtine 6-sulfate, le dermatane sulfate, et agit lentement sur l'acide hyaluronique.

3-6  $\mu$ g d'HSulf-2 traités ou non par l'Actinase E (volume final 7  $\mu$ l) sont digérés par ajout de 5  $\mu$ L de CSase ABC 10 mU dans le tampon de digestion Tris-HCl 20 mM, pH 7,2. Après homogénéisation au Vortex et centrifugation l'incubation se fait pendant une nuit à 37°C.

#### ◁ **Hyaluronidase 4 / Hyal-4**

La HYAL-4 clive les liaisons glycosidiques (1-4)- $\beta$ -N-acétylhexosamine dans l'acide hyaluronique, la chondroïtine.

3-6 µg d'HSulf-2 traités ou non par l'Actinase E (volume final 7 µl) sont digérés par ajout de 0.5 µL de Hyal-4 (1.06 mg/mL) dans le tampon de digestion NaAc 0.1 M, NaCl 0.15 M pH 5.2 Après homogénéisation au Vortex et centrifugation l'incubation se fait pendant 48h à 37°C.

#### 11.2.6 Digestion protéolytique de HSulf-2

##### ◁ **Digestion par l'Actinase E.**

L'actinase E est un mélange de protéases coupant les protéines au niveau des groupements carboxyliques des acides glutamique et aspartique. Appliquée à HSulf-2, l'actinase E permet de libérer le GAG de la partie protéique de HSulf-2. 2 µL d'HSulf-2 (3 µg) sont ajoutés à 1,2 µL d'actinase E à 0,5 mg/mL (20% m/m) dans 8,8 µL de tampon Tris-HCl 20 mM, pH 7,2, soit un volume final de 12 µL. Après homogénéisation au Vortex et centrifugation, l'incubation se fait pendant 24 h à 37°C. La réaction est arrêtée par chauffage à 95°C pendant 15 min.<sup>96</sup>

##### ◁ **Digestion par la Furine.**

La furine est une endopeptidase responsable de la maturation protéolytique de nombreuses protéines. 0.5 aL d'enzyme sont ajoutés à 2-25 ag de substrat. Le volume est complété à 20 aL avec de l'eau. Après homogénéisation au Vortex et centrifugation, l'incubation se fait pendant 6 h à 25°C.

##### ◁ **Digestion par la trypsine**

a) Digestion en solution: la trypsine est une enzyme spécifique hydrolysant la liaison peptidique du côté C-terminal d'une lysine ou d'une arginine, sauf si ces acides aminés sont suivis par une proline.

### Protéolyse en conditions dénaturantes :

HSulf-2 a été digérée en conditions non dénaturantes pour l'analyse des *N*-Glycans. La digestion trypsique a été faite suivant le protocole de Ilham Seffouh.<sup>94</sup>

3 µg de HSulf-2 sont ajoutés à 2,5 µL d'urée à 8 M (2 M final) et à 6,3-5,24 µl de tampon NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 50 mM pH 8,0, et incubés pendant 1 h à température ambiante. La protéine est réduite par ajout de 2 µL de DTT (5 mM final) pendant 1 h à 37°C sous agitation douce. 1 µL d'IAA (20 mM final) sont ajoutés et laissés 45 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière afin d'alkyler les cystéines réduites. L'urée est diluée à 1 M par ajout de 6 µL de tampon NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 50 mM pH 8,0 afin de permettre à la trypsine d'agir. On ajoute 1 µL de trypsine à 0,4 µg/µL. Après homogénéisation au Vortex et centrifugation, l'incubation se fait pendant une nuit à 37°C.

### Protéolyse en conditions non dénaturantes :

Pour l'analyse des ponts disulfure une digestion non dénaturante est nécessaire.

Comme précédemment, 3 µg de HSulf-2 ou du domaine HD ont été dilués dans 5.5 µL de BCAM 50 mM pH 8.0 auquel 2.5µL d'urée 8 M ont été ajoutés (2 M final). Le mélange est incubé 1 h à température ambiante sous agitation douce. 1 µL de trypsine à 0.4 µg/µL est ensuite ajouté avec 7 µL de BCAM 50mM pH 8.0. La solution est incubée une nuit à 37°C.

b) Digestion en gel: après révélation (Instant Blue) des protéines sur SDS-PAGE 10%, la digestion en gel est effectuée selon le protocole suivant :

1- Excision des bandes découpées en cubes de 1 mm<sup>3</sup>

2- Décoloration des bandes

Lavage 5 min avec 50  $\mu$ L  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  0,1 M

Vortex + centrifugation

Lavage 5 min avec 50  $\mu$ L acétonitrile

Ces 3 étapes sont répétées 3 fois.

### 3- Réduction par le DTT 10 mM

Ajouter 50  $\mu$ L de DTT 10 mM

Mettre à 56°C pendant 35 min

Arrêt de la réduction par les lavages suivants :

Lavage 5 min avec 50  $\mu$ L acétonitrile

Lavage 5 min avec 50  $\mu$ L  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  0,1 M

Lavage 5 min avec 50  $\mu$ L acétonitrile

Élimination de l'acétonitrile

### 4- Alkylation par l'iodoacétamide 55 mM

Ajouter dans les échantillons 50  $\mu$ L d'iodoacétamide

Mettre à l'obscurité (papier aluminium + placard) pendant 30 min

Lavage 5 min avec 50  $\mu$ L acétonitrile

Lavage 5 min avec 50  $\mu$ L  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  0,1 M

Lavage 5 min avec 50  $\mu$ L acétonitrile

Éliminer l'acétonitrile

### 5- Digestion par la trypsine

Ajouter 1  $\mu$ L de trypsine à 0.4  $\mu$ g/ $\mu$ L et 39  $\mu$ L de tampon  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  0,1 M

Mettre à 37°C toute la nuit

Récupération du surnageant

### 6- Extraction des peptides

Re-suspension des morceaux de gel dans 50  $\mu$ L de 60% acétonitrile-30%  $\text{HCOOH}$  0,1%.

Ultra-sons pendant 10 min à 37°C

Rassembler les deux surnageants

Évaporer à sec les surnageants au Speed-vac



Reprendre chaque échantillon dans 30 µL de solvant A (acétonitrile/eau/acide formique, 2 :98 :0,1; v/v/v) pour l'analyse par spectrométrie de masse

### 11.2.7 Préparation des peptides protéolytiques pour l'analyse nanoLC-MS/MS

Les digestats effectués en conditions réductrice et non réductrice ont été dessalés pour permettre une meilleure compatibilité avec l'analyse par spectrométrie de masse. La filtration a été faite sur colonne C18 ZipTip (Millipore). Conformément aux instructions du fournisseur un solvant ACN/H<sub>2</sub>O/TFA 20:80:0.1, v/v/v a été utilisé pour éliminer l'urée et les sels. Après filtration, les peptides ont été séchés sous vide (Speedvac) et resuspendus dans un solvant acétonitrile/eau/ Acide formique 2:98:0.1, v/v/v compatible avec la MS.

### 11.2.8 Analyse des peptides par NanoLC-ESI-MS/MS

#### ◁ Conditions de séparation chromatographique et paramètres d'analyse MS

Les peptides séchés sous vide sont resuspendus dans 30 µL de solvant A (acétonitrile/eau/acide formique, 2 :98 :0,1; v/v/v). 5 µL de la solution peptidique sont injectés à un débit de 20 µL / min sur une pré-colonne C18 (C18 Acclaim PepMap, 5 mm x 300 µm, taille des particules 5 µm, porosité 100 Å, Dionex), la séparation des peptides est ensuite effectuée sur une colonne capillaire C18 (C18 Acclaim PepMap, 15 cm x 75 µm, taille des particules 3 µm, porosité 100 Å, Dionex) à un débit de 300 µL / min, selon le gradient suivant: 0% de solvant B (acétonitrile / eau / acide formique 80 :20 :0,1; v/v/v) pendant 6 minutes, 0 à 70% de solvant B en 49 minutes, 70% à 100% de solvant B en 2 minutes, 100% de solvant B pendant 10 minutes et enfin décroissance à 0% de solvant B en 3 minutes. La colonne est finalement ré-équilibrée avec 100% de solvant A pendant 15 minutes.

## < **Conditions d'analyse MS**

Pour les expériences avec fragmentation CID classique, les spectres MS sont enregistrés en mode d'ionisation positive dans l'Orbitrap dans la gamme de  $m/z$  250-1600, avec une résolution de 60000 (à  $m/z$  400), en mode profil.

Les 5 ions les plus intenses sont fragmentés par CID dans le piège ionique (LTQ) automatiquement, avec une énergie de collision normalisée de 35% et une fenêtre de sélection du précurseur de 3 Da. Les espèces mono-chargées ont été exclues de la fragmentation; l'exclusion dynamique des ions précurseurs déjà fragmentés (à  $\pm 1,5 m/z$ ) a été appliquée pendant 300 ms. Le signal MS minimum pour déclencher la fragmentation MS / MS a été réglé à 500. Les spectres MS/MS sont enregistrés en mode centroïde.

Pour les expériences avec fragmentations CID/ETD,<sup>129</sup> les spectres MS sont enregistrés dans l'orbitrap dans la gamme 300 – 2000  $m/z$  en mode profil avec une résolution de 60000. Les trois ions les plus intenses sont fragmentés dans les deux modes en  $MS^2$ , en alternant CID  $MS^2$  et ETD  $MS^2$ . Pendant les scans MS/MS, la fragmentation et la détection se font dans le piège ionique linéaire en mode centroïde. Le contrôle de gain automatique permet l'accumulation de  $10^6$  ions pour les scans FTMS et  $10^4$  ions pour les scans ITMS<sup>n</sup>. Le temps maximum d'injection a été fixé à 500 ms pour la FTMS et 100 ms pour l'ITMS<sup>n</sup>.

Pour les expériences avec fragmentation ETD seule, un temps d'activation de 100 ms a été utilisé et les 6 ions les plus intenses ont été dissociés. Le réactant anionique utilisé pour le transfert d'électron est le fluoranthène. Les spectres sont enregistrés dans la gamme 150 à 2000  $m/z$  en mode profil avec une résolution de 60000.

### 11.2.9 Traitement bio-informatique

Les données ont tout d'abord été analysées à l'aide du logiciel Thermo Xcalibur 2.3.26 de ThermoFisher Scientific. La recherche bio-informatique dans les bases de données a ensuite été effectuée avec le logiciel Byonic v3.6.0 de Protein Metrics INC.<sup>130</sup> Dans un premier temps, les ions diagnostiques des différents glycanes sont extraits avec le logiciel Xcalibur. Ensuite la recherche avec Byonic est effectuée avec les modifications chimiques variables suivantes :

Oxidation / +15.994915 @ M | common1, Carbamyl / +43.005814 @ NTerm, K | common1, Carbamidomethyl / +57.021464 @ C | common1, Deamidated / +0.984016 @ N, Q | common1, FormylGly / -17.992806 @ C | rare1, Pyridylethyl / +105.057849 @ C | rare2, N glycan: Byonic\data\GlycanDatabases\N-glycan 132 human

Les paramètres appliqués sont: digestion semi-tryptique avec deux « missed cleavages », 10 ppm precursor mass tolerance, fragment mass tolerance 0.6 Dalton et pas de « lock mass ».

### 11.2.10 Analyse MALDI-TOF

Avant l'analyse de HSulf-2 par MALDI-TOF, les échantillons sont dessalés par ZipTip C4 (Millipore). Ensuite, l'échantillon dessalé est séché et repris dans 2 µL d'eau. L'échantillon est mélangé avec 1 µL de matrice SA (acide sinapinique) 30 mg/ml dans un mélange acétonitrile/eau/TFA (50:50:0,1 ; v/v/v), puis les 3 µL sont directement déposés sur la plaque MALDI.

L'acquisition des spectres MALDI a été réalisée en polarité positive dans la gamme de masse 20000-150000 Da, le retard à l'extraction a été fixé à 400 ns et 6000 tirs ont été additionnés pour chaque spectre. La fréquence du laser est à 2000 Hertz. Les spectres de masse ont été traités en utilisant le logiciel FlexAnalysis (version 3.4 build 79, Bruker Daltonics).

### 11.2.11 Test d'activité

Pour la mesure d'activité en suivi continu, 2  $\mu$ g de HSulf-2 avec ou sans digestion par les chondroïtinases ABC ou AC sont placés dans une plaque Grenier UV-star Microplaque, 96 puits, COC, Fd F puits cheminée, noir (référence 655809). Le 4-MUS 4 mM est ajouté et le volume est complété à 100  $\mu$ L avec un tampon Tris 50 mM MgCl<sub>2</sub> 10 mM pH 7.5.<sup>168</sup>

La mesure est réalisée en fluorescence avec une excitation à 360 nm et une émission à 465 nm en mode « kinetic loop » : 750 boucles avec mesure toutes les 20 secondes pour un total de 4h09 de cinétique.

### 11.2.12 Analyse RMN

Les spectres RMN ont été acquis à 303K sur un spectromètre Bruker AVIII HD 600MHz. Les expériences effectuées sur des oligosaccharides de CS provenant de HSulf-2 et des CS/DS di- et tetra-oligosaccharide standards sont des analyses de type 1D, 2D 1H-13C HSQC, 1H-13C HMBC, DQF-COSY et TOCSY.

70  $\mu$ g de HSulf-2 ont été ajoutés à 200  $\mu$ L de tampon phosphate de sodium 20 mM, sodium chloride 77 mM pH 7. L'échantillon est ensuite centrifugé sur membrane Amicon 3 kDa. La filtration est réalisée par 5 cycles à 15000 g pour retirer toute trace de glycérol dans l'échantillon. 20  $\mu$ L de HYAL-4 sont ensuite ajoutés et la réaction est réalisée 48 h à 37°C. L'échantillon est ensuite lyophilisé cinq fois dans du D<sub>2</sub>O pour retirer toute trace d'eau (H<sub>2</sub>O) puis repris dans 60  $\mu$ L de D<sub>2</sub>O pour l'analyse RMN dans un tube capillaire.

## Références

1. Buono, M. *et al.* Sulfatase activities towards the regulation of cell metabolism and signaling in mammals. *Cell. Mol. Life Sci.* **67**, 769–780 (2010).
2. Hanson, S. R. *et al.* Sulfatases: Structure, Mechanism, Biological Activity, Inhibition, and Synthetic Utility. *Angew. Chem. Int. Ed.* **43**, 5736–5763 (2004).
3. Diez-Roux, G. *et al.* Sulfatases and human disease. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **6**, 355–379 (2005).
4. Dhamale, O. P. *et al.* Arylsulfatase K is the Lysosomal 2-Sulfoglucuronate Sulfatase. *ACS Chem. Biol.* **12**, 367–373 (2017).
5. Barbeyron, T. *et al.* Matching the Diversity of Sulfated Biomolecules: Creation of a Classification Database for Sulfatases Reflecting Their Substrate Specificity. *PLOS ONE* **11**, e0164846 (2016).
6. Dierks, T. *et al.* Sequence determinants directing conversion of cysteine to formylglycine in eukaryotic sulfatases. *EMBO J.* **18**, 2084–2091 (1999).
7. Knaust, A. *et al.* Residues critical for formylglycine formation and/or catalytic activity of arylsulfatase A. *Biochemistry* **37**, 13941–13946 (1998).
8. Appel, M. J. *et al.* Formylglycine, a Post-Translationally Generated Residue with Unique Catalytic Capabilities and Biotechnology Applications. *ACS Chem. Biol.* **10**, 72–84 (2015).
9. Appel, M. J. *et al.* Formylglycine-generating enzyme binds substrate directly at a mononuclear Cu(I) center to initiate O<sub>2</sub> activation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **116**, 5370–5375 (2019).

10. Bond, C. S. *et al.* Structure of a human lysosomal sulfatase. *Struct. Lond. Engl.* **1993** **5**, 277–289 (1997).
11. Gadler, P. *et al.* New enzymes for biotransformations: microbial alkyl sulfatases displaying stereo- and enantioselectivity. *Trends Biotechnol.* **25**, 83–88 (2007).
12. Dhoot, G. K. Regulation of Wnt Signaling and Embryo Patterning by an Extracellular Sulfatase. *Science* **293**, 1663–1666 (2001).
13. Basner, R. *et al.* N-Acetylglucosamine-6-sulfate sulfatase from human urine. *J. Biol. Chem.* **254**, 1151–1158 (1979).
14. Shilatifard, A. *et al.* Purification and characterization of N-acetylglucosamine-6-sulfate sulfatase from bovine kidney: evidence for the presence of a novel endosulfatase activity. *Biochemistry* **33**, 4273–4282 (1994).
15. Prydz, K. Determinants of Glycosaminoglycan (GAG) Structure. *Biomolecules* **5**, 2003–2022 (2015).
16. Barbara Mulloy. *Glycosaminoglycans and Proteoglycans*. (MDPI, 2018).
17. Morla, S. Glycosaminoglycans and Glycosaminoglycan Mimetics in Cancer and Inflammation. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 1963 (2019).
18. Bülow, H. E. *et al.* The molecular diversity of glycosaminoglycans shapes animal development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **22**, 375–407 (2006).
19. Vivès, R. R. Héparanes sulfate : Structure, fonctions, régulation. Sciences du Vivant Mémoire d'habilitation à diriger la recherche soutenue à l'Université de Grenoble (2011).
20. Ai, X. *et al.* QSulf1 remodels the 6-O sulfation states of cell surface heparan sulfate proteoglycans to promote Wnt signaling. *J. Cell Biol.* **162**, 341–351 (2003).

21. Morimoto-Tomita, M. *et al.* Cloning and Characterization of Two Extracellular Heparin-degrading Endosulfatases in Mice and Humans. *J. Biol. Chem.* **277**, 49175–49185 (2002).
22. Braquart-Varnier, C. *et al.* A subtractive approach to characterize genes with regionalized expression in the gliogenic ventral neuroepithelium: Identification of chick Sulfatase 1 as a new oligodendrocyte lineage gene. *Mol. Cell. Neurosci.* **25**, 612–628 (2004).
23. Winterbottom, E. F. *et al.* Complementary expression of HSPG 6-O-endosulfatases and 6-O-sulfotransferase in the hindbrain of *Xenopus laevis*. *Gene Expr. Patterns* **9**, 166–172 (2009).
24. Freeman, S. D. *et al.* Extracellular regulation of developmental cell signaling by XtSulf1. *Dev. Biol.* **320**, 436–445 (2008).
25. Gorski, B. *et al.* Dynamic expression patterns of 6-O endosulfatases during zebrafish development suggest a subfunctionalisation event for sulf2. *Dev. Dyn.* **239**, 3312–3323 (2010).
26. Fujita, K. *et al.* HpSulf, a heparan sulfate 6-O-endosulfatase, is involved in the regulation of VEGF signaling during sea urchin development. *Mech. Dev.* **127**, 235–245 (2010).
27. Wojcinski, A. *et al.* DSulfatase-1 fine-tunes Hedgehog patterning activity through a novel regulatory feedback loop. *Dev. Biol.* **358**, 168–180 (2011).
28. Lum, D. H. *et al.* Gene Trap Disruption of the Mouse Heparan Sulfate 6-O-Endosulfatase Gene, Sulf2. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 678–688 (2007).
29. Gómez Toledo, A. *et al.* A Systems View of the Heparan Sulfate Interactome. *J. Histochem. Cytochem.* **69**, 105–119 (2021).
30. Ori, A. *et al.* A systems biology approach for the investigation of the heparin/heparan sulfate interactome. *J. Biol. Chem.* **286**, 19892–19904 (2011).

31. Vallet, S. D. *et al.* Glycosaminoglycan-Protein Interactions: The First Draft of the Glycosaminoglycan Interactome. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* **69**, 93–104 (2021).
32. Uchimura, K. *et al.* HSulf-2, an extracellular endoglucosamine-6-sulfatase, selectively mobilizes heparin-bound growth factors and chemokines: effects on VEGF, FGF-1, and SDF-1. *BMC Biochem.* **7**, 2 (2006).
33. Lai, J.-P. *et al.* Sulfatase 2 up-regulates glypican 3, promotes fibroblast growth factor signaling, and decreases survival in hepatocellular carcinoma. *Hepatol. Baltim. Md* **47**, 1211–1222 (2008).
34. Langsdorf, A. *et al.* Expression regulation and function of heparan sulfate 6-O-endosulfatases in the spermatogonial stem cell niche. *Glycobiology* **21**, 152–161 (2011).
35. Lai, J.-P. *et al.* hSulf1 Sulfatase promotes apoptosis of hepatocellular cancer cells by decreasing heparin-binding growth factor signaling. *Gastroenterology* **126**, 231–248 (2004).
36. Wang, S. *et al.* QSulf1, a heparan sulfate 6-O-endosulfatase, inhibits fibroblast growth factor signaling in mesoderm induction and angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 4833–4838 (2004).
37. Narita, K. *et al.* HSulf-1 inhibits angiogenesis and tumorigenesis in vivo. *Cancer Res.* **66**, 6025–6032 (2006).
38. Viviano, B. L. *et al.* Domain-specific modification of heparan sulfate by QSulf1 modulates the binding of the bone morphogenetic protein antagonist Noggin. *J. Biol. Chem.* **279**, 5604–5611 (2004).



39. Otsuki, S. *et al.* Extracellular sulfatases support cartilage homeostasis by regulating BMP and FGF signaling pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 10202–10207 (2010).
40. Narita, K. *et al.* Loss of HSulf-1 Expression Enhances Autocrine Signaling Mediated by Amphiregulin in Breast Cancer\*. *J. Biol. Chem.* **282**, 14413–14420 (2007).
41. Fellgett, S. W. *et al.* Using Confocal Analysis of *Xenopus laevis* to Investigate Modulators of Wnt and Shh Morphogen Gradients. *J. Vis. Exp.* 53162 (2015) doi:10.3791/53162.
42. Schwartz, N. B. *et al.* Chondrodysplasias due to proteoglycan defects. *Glycobiology* **12**, 57R–68R (2002).
43. Thiele, H. *et al.* Loss of chondroitin 6-O-sulfotransferase-1 function results in severe human chondrodysplasia with progressive spinal involvement. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 10155–10160 (2004).
44. Farach-Carson, M. *et al.* Heparan Sulfate Proteoglycans: Key Players in Cartilage Biology. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **15**, 29–48 (2005).
45. Kalus, I. *et al.* Differential involvement of the extracellular 6-O-endosulfatases Sulf1 and Sulf2 in brain development and neuronal and behavioural plasticity. *J. Cell. Mol. Med.* **13**, 4505–4521 (2009).
46. Lamanna, W. C. *et al.* The heparanome--the enigma of encoding and decoding heparan sulfate sulfation. *J. Biotechnol.* **129**, 290–307 (2007).
47. Ai, X. *et al.* SULF1 and SULF2 regulate heparan sulfate-mediated GDNF signaling for esophageal innervation. *Development* **134**, 3327–3338 (2007).
48. Bandari, S. *et al.* Sweet on Hedgehogs: regulatory roles of heparan sulfate proteoglycans in Hedgehog-dependent cell proliferation and differentiation. *Curr. Protein Pept. Sci.* **16**, 66–76 (2015).

49. Kwang, J. *International Review of Cell and Molecular Biology*. (Academic Press, 2016).
50. Seffouh, A. Caractérisation biochimique et fonctionnelle de l'enzyme HSULF. 2016GREAV014. Thèse de doctorat soutenu à l'Université de Grenoble (2016)
51. Singh, V. *et al.* Proteoglycan desulfation: a critical step in oncogenesis? *Front. Biosci. Landmark Ed.* **25**, 760–780 (2020).
52. Lai, J. *et al.* Loss of HSulf-1 up-regulates heparin-binding growth factor signaling in cancer. *J. Biol. Chem.* **278**, 23107–23117 (2003).
53. Lai, J.-P. *et al.* HSulf-1 modulates HGF-mediated tumor cell invasion and signaling in head and neck squamous carcinoma. *Oncogene* **23**, 1439–1447 (2004).
54. Narita, K. *et al.* HSulf-1 inhibits angiogenesis and tumorigenesis in vivo. *Cancer Res.* **66**, 6025–6032 (2006).
55. Chen, F. *et al.* HSulf-1 and palbociclib exert synergistic antitumor effects on RB-positive triple-negative breast cancer. *Int. J. Oncol.* **57**, 223–236 (2020).
56. Liu, L. *et al.* hSulf-1 inhibits cell proliferation and migration and promotes apoptosis by suppressing stat3 signaling in hepatocellular carcinoma. *Oncol. Lett.* **7**, 963–969 (2014).
57. He X1, *et al.* Loss of HSulf-1 expression enhances tumorigenicity by inhibiting Bim expression in ovarian cancer. **135**, 1783–1789 (2014).
58. Backen, A. C. *et al.* Heparan sulphate synthetic and editing enzymes in ovarian cancer. *Br. J. Cancer* **96**, 1544–1548 (2007).
59. Hur, K. *et al.* Up-regulated expression of sulfatases (SULF1 and SULF2) as prognostic and metastasis predictive markers in human gastric cancer. *J. Pathol.* **228**, 88–98 (2012).
60. Junnila, S. *et al.* Gene expression analysis identifies over-expression of CXCL1, SPARC, SPP1, and SULF1 in gastric cancer. *Genes. Chromosomes Cancer* **49**, 28–39 (2010).

61. Li, J. *et al.* Enhanced levels of Hsulf-1 interfere with heparin-binding growth factor signaling in pancreatic cancer. *Mol. Cancer* **4**, (2005).
62. Abiatari, I. *et al.* Hsulf-1 regulates growth and invasion of pancreatic cancer cells. *J. Clin. Pathol.* **59**, 1052–1058 (2006).
63. Nawroth, R. *et al.* Extracellular sulfatases, elements of the Wnt signaling pathway, positively regulate growth and tumorigenicity of human pancreatic cancer cells. *PLoS ONE* **2**, (2007).
64. Bret, C. *et al.* SULFs in human neoplasia: implication as progression and prognosis factors. *J. Transl. Med.* **9**, 72 (2011).
65. Vicente, C. M. *et al.* Enhanced tumorigenic potential of colorectal cancer cells by extracellular sulfatases. *Mol. Cancer Res. MCR* **13**, 510–523 (2015).
66. Morimoto-Tomita, M. *et al.* Sulf-2, a proangiogenic heparan sulfate endosulfatase, is upregulated in breast cancer. *Neoplasia N. Y. N* **7**, 1001–1010 (2005).
67. Staub, J. *et al.* Epigenetic silencing of HSulf-1 in ovarian cancer: Implications in chemoresistance. *Oncogene* **26**, 4969–4978 (2007).
68. Chen, Z. *et al.* Promoter hypermethylation correlates with the HSulf-1 silencing in human breast and gastric cancer. *Int. J. Cancer* **124**, 739–744 (2009).
69. Monneret, C. Histone deacetylase inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **40**, 1–13 (2005).
70. Khurana, A. *et al.* Role of heparan sulfatases in ovarian and breast cancer. *Am. J. Cancer Res.* **3**, 34–45 (2013).
71. Khurana, A. *et al.* Silencing of HSulf-2 expression in MCF10DCIS cells attenuate ductal carcinoma in situ progression to invasive ductal carcinoma in vivo. *Breast Cancer Res. BCR* **14**, R43 (2012).

72. Khurana, A. *et al.* Matrix detachment and proteasomal inhibitors diminish Sulf-2 expression in breast cancer cell lines and mouse xenografts. *Clin. Exp. Metastasis* **30**, 407–415 (2013).
73. Kumagai, S. *et al.* Impact of Sulfatase-2 on cancer progression and prognosis in patients with renal cell carcinoma. *Cancer Sci.* **107**, 1632–1641 (2016).
74. Zhu, C. *et al.* Sulfatase 2 promotes breast cancer progression through regulating some tumor-related factors. *Oncol. Rep.* **35**, 1318–1328 (2016).
75. Zhu, C. *et al.* Sulfatase 2 facilitates lymphangiogenesis in breast cancer by regulating VEGF-D. *Oncol. Rep.* **36**, 3161–3171 (2016).
76. Dai, Y. *et al.* HSulf-1 and HSulf-2 are potent inhibitors of myeloma tumor growth in vivo. *J. Biol. Chem.* **280**, 40066–40073 (2005).
77. Peterson, S. M. *et al.* Human Sulfatase 2 inhibits in vivo tumor growth of MDA-MB-231 human breast cancer xenografts. *BMC Cancer* **10**, 427 (2010).
78. Singer, M. S. *et al.* SULF2, a heparan sulfate endosulfatase, is present in the blood of healthy individuals and increases in cirrhosis. *Clin. Chim. Acta* **440**, 72–78 (2015).
79. Lui, N. S. *et al.* SULF2 Expression Is a Potential Diagnostic and Prognostic Marker in Lung Cancer. *Plos One* **11**, e0148911 (2016).
80. Lemjabbar-Alaoui, H. *et al.* Sulf-2, a heparan sulfate endosulfatase, promotes human lung carcinogenesis. *Oncogene* **29**, 635–46 (2010).
81. Lai, J. *et al.* Sulfatase 2 Up-Regulates Glypican 3, Promotes Fibroblast Growth Factor Signaling, and Decreases Survival in Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology* **47**, 1211–1222 (2008).

82. Tao, Y. *et al.* Sulfatase-2 promotes the growth and metastasis of colorectal cancer by activating Akt and Erk1/2 pathways. *Biomed. Pharmacother.* **89**, 1370–1377 (2017).
83. Holst, C. R. *et al.* Secreted Sulfatases Sulf1 and Sulf2 Have Overlapping yet Essential Roles in Mouse Neonatal Survival. *PLOS ONE* **2**, e575 (2007).
84. Ai, X. *et al.* SULF1 and SULF2 regulate heparan sulfate-mediated GDNF signaling for esophageal innervation. *Development*, (2007)
85. Otsuki, S. *et al.* Suppression of cartilage degeneration by intra-articular injection of heparan sulfate 6-O endosulfatase in a mouse osteoarthritis model. *Histol. Histopathol.* **32**, 725–733 (2017).
86. Chanalaris, A. *et al.* Heparan Sulfate Proteoglycan Synthesis Is Dysregulated in Human Osteoarthritic Cartilage. *Am. J. Pathol.* (2019)
87. Severmann, A.-C. *et al.* An altered heparan sulfate structure in the articular cartilage protects against osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* (2020)
88. Hassing, H. C. *et al.* Inhibition of hepatic sulfatase-2 in vivo: a novel strategy to correct diabetic dyslipidemia. **40**, 1301–1315 (2012).
89. Hassing, H. C. *et al.* SULF2 strongly predisposes to fasting and postprandial triglycerides in patients with obesity and type 2 diabetes mellitus. **22**, 1309–1316 (2015).
90. Dierks, T. *et al.* Multiple Sulfatase Deficiency Is Caused by Mutations in the Gene Encoding the Human C-(alpha)Formylglycine Generating Enzyme. *Cell* (2003).
91. Ai, X. *et al.* Remodeling of Heparan Sulfate Sulfation by Extracellular Endosulfatases. in *Chemistry and Biology of Heparin and Heparan Sulfate* (eds. Garg, H. G., Linhardt, R. J. & Hales, C. A.) 245–258 (Elsevier Science, 2005).

92. Frese, M.-A. *et al.* Characterization of the Human Sulfatase Sulf1 and Its High Affinity Heparin/Heparan Sulfate Interaction Domain. *J. Biol. Chem.* **284**, 28033–28044 (2009).
93. Ambasta, R. K. *et al.* Quail Sulf1 function requires asparagine-linked glycosylation. *J. Biol. Chem.* **282**, 34492–34499 (2007).
94. Seffouh, I. *et al.* Mass spectrometry analysis of the human endosulfatase Hsulf-2. *Biochem. Biophys. Rep.* **18**, 100617 (2019).
95. Tang, R. *et al.* Functional Consequences of the Subdomain Organization of the Sulfs. *J. Biol. Chem.* **284**, 21505–21514 (2009).
96. Seffouh, I. Analyse protéomique des endosulfatases humaines HSulfs, enzymes clés de la modulation de la sulfatation de l'héparane sulfate 2018SACLE031. Thèse de doctorat soutenue à l'Université Paris Saclay (2018).
97. Bolt, G. *et al.* Posttranslational N-glycosylation takes place during the normal processing of human coagulation factor VII. *Glycobiology* **15**, 541–547 (2005).
98. Uchimura, K. *et al.* Measuring the Activities of the Sulfs: Two Novel Heparin/Heparan Sulfate Endosulfatases. in *Methods in Enzymology* vol. 416 243–253 (Elsevier, 2006).
99. The UniProt Consortium. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Res.* **49**, D480–D489 (2021).
100. Uchimura, K. *et al.* Use of a phage display antibody to measure the enzymatic activity of the Sulfs. *Methods Enzymol.* **480**, 51–64 (2010).
101. Litjens, T. *et al.* Expression, purification and characterization of recombinant caprine N-acetylglucosamine-6-sulphatase. *Biochem. J.* **327** ( Pt 1), 89–94 (1997).

102. Robertson, D. A. *et al.* cDNA clone for human glucosamine-6-sulphatase reveals differences between arylsulphatases and non-arylsulphatases. *Biochem. J.* **288**, 539–44 (1992).
103. Staples, G. O. *et al.* Glycomics Analysis of Mammalian Heparan Sulfates Modified by the Human Extracellular Sulfatase HSulf2. *PLoS ONE* **6**, e16689 (2011).
104. Seffouh, A. *et al.* HSulf sulfatases catalyze processive and oriented 6- O -desulfation of heparan sulfate that differentially regulates fibroblast growth factor activity. *FASEB J.* **27**, 2431–2439 (2013).
105. Walhorn, V. *et al.* Exploring the Sulfatase 1 Catch Bond Free Energy Landscape using Jarzynski's Equality. *Sci. Rep.* **8**, 16849 (2018).
106. Seffouh, A. *et al.* Expression and purification of recombinant extracellular sulfatase HSulf-2 allows deciphering of enzyme sub-domain coordinated role for the binding and 6-O-desulfation of heparan sulfate. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **76**, 1807–1819 (2019).
107. Lamanna, W. C. *et al.* Sulf loss influences N-, 2-O-, and 6-O-sulfation of multiple heparan sulfate proteoglycans and modulates fibroblast growth factor signaling. *J. Biol. Chem.* **283**, 27724–27735 (2008).
108. El Masri, R. Remodeling of heparan sulfate : functional and structural characterization of human endosulfatase HSulf-2. 2019GREAV037. Thèse de doctorat soutenue à l'Université de Grenoble (2016).
109. El Masri, R. *et al.* Extracellular endosulfatase Sulf-2 harbours a chondroitin/dermatan sulfate chain that modulates its enzyme activity. (2021)
110. Wang, W. *et al.* Hyaluronidase and Chondroitinase. in *Protein Reviews* (ed. Atassi, M. Z.) vol. 925 75–87 (Springer Singapore, 2016).

111. Sarrazin, S. *et al.* Characterization and binding activity of the chondroitin/dermatan sulfate chain from Endocan, a soluble endothelial proteoglycan. *Glycobiology* **20**, 1380–1388 (2010).
112. Karamanos, N. K. *et al.* Proteoglycan Chemical Diversity Drives Multifunctional Cell Regulation and Therapeutics. *Chem. Rev.* **118**, 9152–9232 (2018).
113. Noborn, F. *et al.* Identification of Chondroitin Sulfate Linkage Region Glycopeptides Reveals Prohormones as a Novel Class of Proteoglycans. *Mol. Cell. Proteomics* **14**, 41–49 (2015).
114. Rnjak-Kovacina, J. *et al.* Glycosaminoglycan and Proteoglycan-Based Biomaterials: Current Trends and Future Perspectives. *Adv. Healthc. Mater.* **7**, e1701042 (2018).
115. Kasinathan, N. *et al.* Chondroitinase: A promising therapeutic enzyme. *Crit. Rev. Microbiol.* **42**, 474–484 (2016).
116. Yamagata, T. *et al.* Purification and properties of bacterial chondroitinases and chondrosulfatases. *J. Biol. Chem.* **243**, 1523–1535 (1968).
117. Kaneiwa, T. *et al.* Identification of human hyaluronidase-4 as a novel chondroitin sulfate hydrolase that preferentially cleaves the galactosaminidic linkage in the trisulfated tetrasaccharide sequence. *Glycobiology* **20**, 300–309 (2010).
118. Farrugia, B. L. *et al.* Hyaluronidase-4 is produced by mast cells and can cleave serglycin chondroitin sulfate chains into lower molecular weight forms. *J. Biol. Chem.* **294**, 11458–11472 (2019).
119. He, J. *et al.* Construction of saturated odd- and even-numbered hyaluronan oligosaccharide building block library. *Carbohydr. Polym.* **231**, 115700 (2020).



120. Huckerby, T. N. *et al.* Characterization of oligosaccharides from the chondroitin sulfates: <sup>1</sup>H-NMR and <sup>13</sup>C-NMR studies of reduced disaccharides and tetrasaccharides. *Eur. J. Biochem.* **268**, 1181–1189 (2001).
121. Song, Y. *et al.* Analysis of the Glycosaminoglycan Chains of Proteoglycans. *J. Histochem. Cytochem.* **69**, 121–135 (2021).
122. Cherepanova, N. *et al.* N-linked glycosylation and homeostasis of the endoplasmic reticulum. *Curr. Opin. Cell Biol.* **41**, 57–65 (2016).
123. Reily, C. *et al.* Glycosylation in health and disease. *Nat. Rev. Nephrol.* **15**, 346–366 (2019).
124. Lannoo, N. *et al.* Review/N-glycans: The making of a varied toolbox. *Plant Sci.* **239**, 67–83 (2015).
125. Stanley, P. *et al.* N-Glycans. in *Essentials of Glycobiology* (eds. Varki, A. *et al.*) (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2015).
126. Al-Kinani, K. *et al.* Modifying the Fc Asn297 Glycan of Human IgG2 Subclass for Improved Antibody Therapeutics and Design of Site-Specific Antibody Drug Conjugates. (2017).
127. Mann, M. *et al.* Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat. Biotechnol.* **21**, 255–261 (2003).
128. Gupta, R. *et al.* Prediction of glycosylation across the human proteome and the correlation to protein function. *Pac. Symp. Biocomput. Pac. Symp. Biocomput.* 310–322 (2002).
129. Mechref, Y. Use of CID/ETD Mass Spectrometry to Analyze Glycopeptides. in *Current Protocols in Protein Science* (2012)

130. Bern, M. *et al.* Byonic: Advanced Peptide and Protein Identification Software. *Curr. Protoc. Bioinforma.* **40**, (2012).
131. Yang, H. *et al.* Mass spectrometric analysis of asparagine deamidation and aspartate isomerization in polypeptides. *Electrophoresis* **31**, 1764–1772 (2010).
132. Woo, C. M. *et al.* Mapping and Quantification of Over 2000 O-linked Glycopeptides in Activated Human T Cells with Isotope-Targeted Glycoproteomics (Isotag) \*. *Mol. Cell. Proteomics* **17**, 764–775 (2018).
133. Powlesland, A. S. *et al.* Targeted glycoproteomic identification of cancer cell glycosylation. *Glycobiology* **19**, 899–909 (2009).
134. Parry, S. *et al.* N-Glycosylation of the MUC1 mucin in epithelial cells and secretions. *Glycobiology* **16**, 623–634 (2006).
135. Cormerais, Y. Acides aminés et cancer : LAT1, un transporteur essentiel à l'activité mTORC1 et la croissance tumorale. 2016NICE4047. Thèse de doctorat soutenue à l'Université Nice Sophia Antipolis (2016).
136. Peterson, S. M. *et al.* Human Sulfatase 2 inhibits in vivo tumor growth of MDA-MB-231 human breast cancer xenografts. *BMC Cancer* **10**, 427 (2010).
137. Zhu, C. *et al.* Sulfatase 2 promotes breast cancer progression through regulating some tumor-related factors. *Oncol. Rep.* **35**, 1318–1328 (2016).
138. Simons, J. Mechanisms for S–S and N–Ca bond cleavage in peptide ECD and ETD mass spectrometry. *Chem. Phys. Lett.* **484**, 81–95 (2010).
139. Li, X. *et al.* Characterization of Protein Disulfide Linkages by MS In-Source Dissociation Comparing to CID and ETD Tandem MS. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **30**, 519–528 (2019).

140. Frand, A. R. *et al.* Pathways for protein disulphide bond formation. *Trends Cell Biol.* **10**, 203–210 (2000).
141. Vivès, R. R. Héparanes sulfate : Structure, fonctions, régulation. (Université de Grenoble, 2011).
142. Boyer P.D. The Enzymes, Vol V: Hydrolysis (Sulfate Esters, Carboxyl Esters, Glycosides), Hydration, 3rd Edition
143. Zhang, L. *et al.* 6-O-sulfotransferase-1 represents a critical enzyme in the anticoagulant heparan sulfate biosynthetic pathway. *J. Biol. Chem.* **276**, 42311–42321 (2001).
144. Roy, A. B. Sulfatases from *Helix pomatia*. *Methods Enzymol.* **143**, 361–366 (1987).
145. Wittstock, U. *et al.* Cloning and characterization of two cDNAs encoding sulfatases in the Roman snail, *Helix pomatia*. *IUBMB Life* **49**, 71–76 (2000).
146. Bilong, M. *et al.* Mammal Hyaluronidase Activity on Chondroitin Sulfate and Dermatan Sulfate: Mass Spectrometry Analysis of Oligosaccharide Products. *Glycobiology* (2021)
147. Lioe, H. *et al.* A novel salt bridge mechanism highlights the need for nonmobile proton conditions to promote disulfide bond cleavage in protonated peptides under low-energy collisional activation. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **18**, 1109–1123 (2007).
148. Ueberheide, B. M. *et al.* Rapid sensitive analysis of cysteine rich peptide venom components. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 6910–6915 (2009).
149. Clark, D. F. *et al.* Simple approach to assign disulfide connectivity using extracted ion chromatograms of electron transfer dissociation spectra. *Anal. Chem.* **85**, 1192–1199 (2013).
150. Cole, S. R. *et al.* Electron Transfer Dissociation (ETD) of Peptides Containing Intrachain Disulfide Bonds. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **23**, 310–320 (2012).

151. Creese, A. J. *et al.* Liquid chromatography electron capture dissociation tandem mass spectrometry (LC-ECD-MS/MS) versus liquid chromatography collision-induced dissociation tandem mass spectrometry (LC-CID-MS/MS) for the identification of proteins. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **18**, 891–897 (2007).
152. Liu, F. *et al.* Facilitating Protein Disulfide Mapping by a Combination of Pepsin Digestion, Electron Transfer Higher Energy Dissociation (ET<sub>h</sub>cD), and a Dedicated Search Algorithm SlinkS. *Mol. Cell. Proteomics* **13**, 2776–2786 (2014).
153. Riley, N. M. *et al.* The Role of Electron Transfer Dissociation in Modern Proteomics. *Anal. Chem.* **90**, 40–64 (2018).
154. Tan, L. *et al.* Radical cascades in electron transfer dissociation (ETD) – implications for characterizing peptide disulfide regio-isomers. *Analyst* **138**, 6759–6765 (2013).
155. Vivès, R. R. *et al.* Post-Synthetic Regulation of HS Structure: The Yin and Yang of the Sulfis in Cancer. *Front. Oncol.* **3**, (2014).
156. Zubarev, R. A. *et al.* Electron Capture Dissociation of Gaseous Multiply-Charged Proteins Is Favored at Disulfide Bonds and Other Sites of High Hydrogen Atom Affinity. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 2857–2862 (1999).
157. Zubarev, R. A. *et al.* Electron Capture Dissociation of Multiply Charged Protein Cations. A Nonergodic Process. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 3265–3266 (1998).
158. Fung, Y. M. E. *et al.* Facile Disulfide Bond Cleavage in Gaseous Peptide and Protein Cations by Ultraviolet Photodissociation at 157 nm. *Angew. Chem. Int. Ed.* **44**, 6399–6403 (2005).
159. Jumper, J. *et al.* Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* **596**, 583–589 (2021).

160. Walls, A. C. *et al.* Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell* **181**, 281-292.e6 (2020).
161. Remacle, A. G. *et al.* Substrate Cleavage Analysis of Furin and Related Proprotein Convertases. *J. Biol. Chem.* **283**, 20897–20906 (2008).
162. Baud, A. *et al.* SOLEIL shining on the solution-state structure of biomacromolecules by synchrotron X-ray footprinting at the Metrology beamline. *J. Synchrotron Radiat.* **24**, 576–585 (2017).
163. Baud, A. *et al.* Probing the solution structure of factor H using Hydroxyl radical protein footprinting and cross-linking. *Biochem. J.* **473**, (2016).
164. Cravello, L. Etudes structurales des proteines par spectrometrie de masse couplee aux echanges hydrogene/deuterium et a la reticulation chimique. Thèse de doctorat soutenue à l' Université Joseph-Fourier - Grenoble I (2005)
165. Lau, A. M. *et al.* Structural predictions of the functions of membrane proteins from HDX-MS. *Biochem. Soc. Trans.* **48**, 971–979 (2020).
166. Masson, G. R. *et al.* An overview of hydrogen deuterium exchange mass spectrometry (HDX-MS) in drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* **12**, 981–994 (2017).
167. Narang, D. *et al.* HDX-MS: An Analytical Tool to Capture Protein Motion in Action. *Biomedicines* **8**, E224 (2020).
168. Masri, R. E. *et al.* Extracellular endosulfatase Sulf-2 harbours a chondroitin/dermatan sulfate chain that modulates its enzyme activity. *bioRxiv* 2021.01.04.425218 (2021)
169. Quellier, P. Synthèse d'inhibiteurs d'endosulfatases humaines : vers de nouveaux outils thérapeutiques contre le cancer et les maladies inflammatoires. 2020UPASF008 Thèse de doctorat soutenue à l'Université Paris-Saclay (2020).

170. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685 (1970).
171. Bodet, P.-E. *et al.* Efficient recovery of glycosaminoglycan oligosaccharides from polyacrylamide gel electrophoresis combined with mass spectrometry analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* **409**, 1257–1269 (2017).

## **Annexes**

**Tableau A.10 : Numérotation des résidus de HSulf-2 cités dans ce manuscrit selon la numérotation UniprotKB (comprenant le peptide signal) et la numérotation sans peptide signal utilisée dans ce manuscrit. Le peptide signal est composé de 24 acides aminés (aa).**

|   | Numérotation <b>comprenant</b> le peptide signal                         | Numérotation <b>ne comprenant pas</b> le peptide signal (-24 aa)         |
|---|--|--|
| FormylGlycine                           | C88  | C64  |
| Coupure Furine                          | R538   | R514   |
| Serine portant le GAG                   | S583   | S559   |
| Ponts disulfure :                       | C113-C822<br>C446-C464<br>C455-C477<br>C504-C660<br>C506-C662            | C89-C798<br>C422-C440<br>C431-C453<br>C480-C636<br>C482-C638             |
| <i>N</i> -glycanes :                    | N112<br>N149<br>N198<br>N241<br>N561                                     | N88<br>N125<br>N174<br>N217<br>N537                                      |
| Séquences entourant le site catalytique | <sup>179</sup> VKEK <sup>182</sup><br><sup>401</sup> LKKK <sup>404</sup> | <sup>155</sup> VKEK <sup>158</sup><br><sup>377</sup> LKKK <sup>380</sup> |



Tableau A.11 : Affectations des ions observés dans le spectre ESI-Orbitrap du digestat CS-A

(Figure 16.A)

| Assignment                                  | Experimental <i>m/z</i> | Theoretical <i>m/z</i> | ppm error | Intensity |
|---|-------------------------|------------------------|-----------|-----------|
| (dp2-2H) <sup>2-</sup>                      | 237.5319                | 237.5321               | -0.84     | 9.15E+03  |
| GalNAc-(dp3-3H) <sup>3-</sup>               | 252.3641                | 252.3644               | -1.19     | 6.90E+03  |
| GalNAc-(dp3-2H) <sup>2-</sup>               | 379.0483                | 379.0502               | -5.01     | 1.69E+03  |
| (dp4-3H-SO <sub>3</sub> ) <sup>3-</sup>     | 284.3882                | 284.3895               | -4.57     | 9.35E+02  |
| (dp4-3H) <sup>3-</sup>                      | 311.0417                | 311.0418               | -0.32     | 6.89E+04  |
| (dp4-4H+Na) <sup>3-</sup>                   | 318.3682                | 318.3691               | -2.83     | 2.51E+03  |
| (dp4-2H-SO <sub>3</sub> ) <sup>2-</sup>     | 427.086                 | 427.0879               | -4.45     | 9.16E+02  |
| (dp4-2H) <sup>2-</sup>                      | 467.0627                | 467.0663               | -7.71     | 4.52E+02  |
| (dp4-3H+Na) <sup>2-</sup>                   | 478.0544                | 478.0573               | -6.07     | 1.31E+03  |
| (dp4-4H+2Na) <sup>2-</sup>                  | 489.0461                | 489.0482               | -4.29     | 1.57E+03  |
| GalNAc-(dp5-4H) <sup>4-</sup>               | 303.788                 | 303.7885               | -1.65     | 2.49E+03  |
| GalNAc-(dp5-3H) <sup>3-</sup>               | 405.3857                | 405.3872               | -3.70     | 1.63E+03  |
| GlcUA-(dp5-4H) <sup>4-</sup>                | 277.0367                | 277.0375               | -2.89     | 1.17E+02  |
| (dp6-5H) <sup>5-</sup>                      | 278.0355                | 278.0358               | -1.08     | 7.77E+03  |
| (dp6-4H-SO <sub>3</sub> ) <sup>4-</sup>     | 327.8066                | 327.8074               | -2.44     | 4.21E+03  |
| (dp6-5H+Na-SO <sub>3</sub> ) <sup>4-</sup>  | 333.3016                | 333.3029               | -3.90     | 1.58E+02  |
| (dp6-4H) <sup>4-</sup>                      | 347.7969                | 347.7966               | 0.86      | 1.50E+05  |
| (dp6-5H+Na) <sup>4-</sup>                   | 353.2915                | 353.2921               | -1.70     | 1.01E+04  |
| (dp6-6H+2Na) <sup>4-</sup>                  | 358.7862                | 358.7875               | -3.62     | 8.96E+02  |
| (dp6-3H-SO <sub>3</sub> ) <sup>3-</sup>     | 437.411                 | 437.4122               | -2.74     | 5.85E+03  |
| (dp6-4H+Na-SO <sub>3</sub> ) <sup>3-</sup>  | 444.737                 | 444.7396               | -5.85     | 6.13E+02  |
| (dp6-5H+2Na-SO <sub>3</sub> ) <sup>3-</sup> | 452.0658                | 452.0669               | -2.43     | 5.41E+02  |
| (dp6-3H) <sup>3-</sup>                      | 464.064                 | 464.0645               | -1.08     | 6.27E+04  |
| (dp6-4H+Na) <sup>3-</sup>                   | 471.3888                | 471.3918               | -6.36     | 7.52E+03  |
| (dp6-5H+2Na) <sup>3-</sup>                  | 478.7163                | 478.7191               | -5.85     | 3.56E+03  |
| (dp6-6H+3Na) <sup>3-</sup>                  | 486.0442                | 486.0465               | -4.73     | 1.93E+03  |
| (dp6-2H-SO <sub>3</sub> ) <sup>2-</sup>     | 656.621                 | 656.622                | -1.52     | 5.42E+02  |
| (dp6-3H-SO <sub>3</sub> +Na) <sup>2-</sup>  | 667.6114                | 667.613                | -2.40     | 1.54E+02  |
| (dp6-4H-SO <sub>3</sub> +2Na) <sup>2-</sup> | 678.6025                | 678.604                | -2.21     | 2.35E+02  |
| (dp6-5H-SO <sub>3</sub> +3Na) <sup>2-</sup> | 689.5958                | 689.5949               | 1.31      | 1.47E+02  |
| (dp6-3H+Na) <sup>2-</sup>                   | 707.5896                | 707.5914               | -2.54     | 3.63E+02  |
| (dp6-4H+2Na) <sup>2-</sup>                  | 718.58                  | 718.5824               | -3.34     | 5.32E+02  |
| (dp6-5H+3Na) <sup>2-</sup>                  | 729.5713                | 729.5733               | -2.74     | 1.50E+03  |
| (dp6-6H+4Na) <sup>2-</sup>                  | 740.5622                | 740.5643               | -2.84     | 1.55E+03  |
| GalNAc-(dp7-5H) <sup>5-</sup>               | 334.6428                | 334.643                | -0.60     | 3.74E+03  |
| GalNAc-(dp7-4H) <sup>4-</sup>               | 418.5541                | 418.5556               | -3.58     | 3.92E+03  |
| GalNAc-(dp7-5H+Na) <sup>4-</sup>            | 424.0496                | 424.0511               | -3.54     | 7.01E+02  |
| (dp8-6H-SO <sub>3</sub> ) <sup>6-</sup>     | 294.7128                | 294.7139               | -3.73     | 1.49E+02  |
| (dp8-6H) <sup>6-</sup>                      | 308.0395                | 308.0400               | -1.62     | 2.80E+03  |
| (dp8-7H+Na) <sup>6-</sup>                   | 311.7091                | 311.7037               | 17.32     | 1.61E+03  |
| (dp8-5H-SO <sub>3</sub> ) <sup>5-</sup>     | 353.8569                | 353.8581               | -3.39     | 2.90E+03  |
| (dp8-6H+Na-SO <sub>3</sub> ) <sup>5-</sup>  | 358.2532                | 358.2545               | -3.63     | 3.95E+02  |
| (dp8-5H) <sup>5-</sup>                      | 369.8497                | 369.8495               | 0.54      | 7.42E+04  |
| (dp8-6H+Na) <sup>5-</sup>                   | 374.2447                | 374.2458               | -2.94     | 6.74E+03  |
| (dp8-8H+3Na) <sup>5-</sup>                  | 383.0371                | 383.0386               | -3.92     | 1.42E+02  |
| (dp8-4H-SO <sub>3</sub> ) <sup>4-</sup>     | 442.5731                | 442.5744               | -2.94     | 6.89E+03  |
| (dp8-4H-SO <sub>3</sub> +Na) <sup>4-</sup>  | 448.0675                | 448.0699               | -5.36     | 2.56E+03  |
| (dp8-4H) <sup>4-</sup>                      | 462.5634                | 462.5636               | -0.43     | 4.48E+04  |
| (dp8-5H+Na) <sup>4-</sup>                   | 468.0556                | 468.0591               | -7.48     | 6.06E+03  |
| (dp8-6H+2Na) <sup>4-</sup>                  | 473.5511                | 473.5546               | -7.39     | 2.47E+03  |
| (dp8-8H+4Na) <sup>4-</sup>                  | 484.5433                | 484.5456               | -4.75     | 3.08E+02  |

|   |          |          |       |          |
|---|----------|----------|-------|----------|
| (dp8-3H-SO <sub>3</sub> ) <sup>3-</sup>         | 590.4335 | 590.435  | -2.54 | 4.24E+03 |
| (dp8-4H-SO <sub>3</sub> +Na) <sup>3-</sup>      | 597.7605 | 597.7623 | -3.01 | 1.37E+03 |
| (dp8-5H-SO <sub>3</sub> +2Na) <sup>3-</sup>     | 605.0883 | 605.0896 | -2.15 | 7.49E+02 |
| (dp8-6H-SO <sub>3</sub> +3Na) <sup>3-</sup>     | 612.4159 | 612.417  | -1.80 | 5.24E+02 |
| (dp8-4H+Na) <sup>3-</sup>                       | 624.4131 | 624.4146 | -2.40 | 9.81E+02 |
| (dp8-5H+2Na) <sup>3-</sup>                      | 631.7403 | 631.7419 | -2.53 | 8.26E+02 |
| (dp8-6H+3Na) <sup>3-</sup>                      | 639.0676 | 639.0692 | -2.50 | 1.17E+03 |
| (dp8-7H+4Na) <sup>3-</sup>                      | 646.3946 | 646.3965 | -2.94 | 1.32E+03 |
| GalNAc-(dp9-7H) <sup>7-</sup>                   | 304.3232 | 304.3241 | -2.96 | 3.05E+02 |
| GalNAc-(dp9-6H) <sup>6-</sup>                   | 355.2113 | 355.2127 | -3.94 | 2.46E+03 |
| GalNAc-(dp9-5H) <sup>5-</sup>                   | 426.4554 | 426.4567 | -3.05 | 4.53E+03 |
| GalNAc-(dp9-8H+3Na) <sup>5-</sup>               | 430.8507 | 430.8531 | -5.57 | 1.30E+03 |
| GlcUA-(dp9-4H) <sup>4-</sup>                    | 506.5698 | 506.5717 | -3.75 | 2.23E+03 |
| GlcUA-(dp9-5H+Na) <sup>4-</sup>                 | 512.0647 | 512.0671 | -4.69 | 9.59E+02 |
| (dp10-7H) <sup>7-</sup>                         | 329.4709 | 329.4716 | -2.12 | 7.76E+02 |
| (dp10-8H+Na) <sup>7-</sup>                      | 332.6112 | 332.6118 | -1.80 | 1.89E+02 |
| (dp10-6H-SO <sub>3</sub> ) <sup>6-</sup>        | 371.2229 | 371.2252 | -6.20 | 1.40E+03 |
| (dp10-6H) <sup>6-</sup>                         | 384.5508 | 384.5514 | -1.56 | 1.79E+04 |
| (dp10-7H+Na) <sup>6-</sup>                      | 388.2133 | 388.215  | -4.38 | 3.41E+03 |
| (dp10-8H+2Na) <sup>6-</sup>                     | 391.8768 | 391.8787 | -4.85 | 8.21E+02 |
| (dp10-5H-SO <sub>3</sub> ) <sup>5-</sup>        | 445.6693 | 445.6717 | -5.39 | 3.73E+03 |
| (dp10-6H-SO <sub>3</sub> +Na) <sup>5-</sup>     | 450.0656 | 450.0681 | -5.55 | 9.91E+02 |
| (dp10-5H) <sup>5-</sup>                         | 461.6611 | 461.6631 | -4.33 | 9.82E+03 |
| (dp10-6H+Na) <sup>5-</sup>                      | 466.0556 | 466.0595 | -8.37 | 4.52E+03 |
| (dp10-7H+2Na) <sup>5-</sup>                     | 470.4516 | 470.4559 | -9.14 | 1.55E+03 |
| (dp10-8H+3Na) <sup>5-</sup>                     | 474.8484 | 474.8523 | -8.21 | 5.00E+02 |
| (dp10-4H-2SO <sub>3</sub> ) <sup>4-</sup>       | 537.3506 | 537.3523 | -3.16 | 7.98E+02 |
| (dp10-4H-SO <sub>3</sub> ) <sup>4-</sup>        | 557.3402 | 557.3415 | -2.33 | 5.00E+03 |
| (dp10-6H-SO <sub>3</sub> +2Na) <sup>4-</sup>    | 568.3308 | 568.3325 | -2.99 | 9.99E+02 |
| (dp10-5H+Na) <sup>4-</sup>                      | 582.8245 | 582.8262 | -2.92 | 9.91E+02 |
| (dp10-6H+2Na) <sup>4-</sup>                     | 588.3198 | 588.3217 | -3.23 | 8.99E+02 |
| (dp10-8H+4Na) <sup>4-</sup>                     | 599.3111 | 599.3127 | -2.67 | 5.35E+02 |
| GalNAc-(dp11-8H) <sup>8-</sup>                  | 323.5406 | 323.5412 | -1.85 | 2.35E+02 |
| GalNAc-(dp11-9H+Na) <sup>8-</sup>               | 326.2884 | 326.289  | -1.84 | 8.50E+01 |
| GalNAc-(dp11-6H+Na) <sup>5-</sup>               | 522.6665 | 522.6667 | -0.38 | 2.81E+02 |
| GalNAc-(dp11-9H+2Na) <sup>7-</sup>              | 376.1852 | 376.1859 | -1.86 | 1.84E+02 |
| GalNAc-(dp11-6H) <sup>6-</sup>                  | 431.7222 | 431.7241 | -4.40 | 2.92E+03 |
| (dp12-8H) <sup>8-</sup>                         | 345.5462 | 345.5453 | 2.60  | 2.57E+02 |
| (dp12-7H) <sup>7-</sup>                         | 395.0512 | 395.0528 | -4.05 | 4.15E+03 |
| (dp12-8H+Na) <sup>7-</sup>                      | 398.1911 | 398.193  | -4.77 | 1.87E+03 |
| (dp12-9H+2Na) <sup>7-</sup>                     | 401.3327 | 401.3333 | -1.50 | 6.02E+02 |
| (dp12-10H+3Na) <sup>7-</sup>                    | 404.4724 | 404.4736 | -2.97 | 2.66E+02 |
| (dp12-6H-SO <sub>3</sub> ) <sup>6-</sup>        | 447.7338 | 447.7366 | -6.25 | 1.67E+03 |
| (dp12-6H) <sup>6-</sup>                         | 461.0609 | 461.0628 | -4.12 | 7.31E+03 |
| (dp12-8H+3Na) <sup>5-</sup>                     | 566.6639 | 566.6659 | -3.53 | 4.71E+02 |
| (dp12-7H+2Na) <sup>5-</sup>                     | 562.2676 | 562.2695 | -3.38 | 7.91E+02 |
| (dp12-5H-SO <sub>3</sub> ) <sup>5-</sup>        | 537.4838 | 537.4854 | -2.98 | 2.79E+03 |
| (dp12-7H-SO <sub>3</sub> +2Na) <sup>5-</sup>    | 546.277  | 546.2782 | -2.20 | 6.57E+02 |
| GalNAc-(dp13-7H) <sup>7-</sup>                  | 435.4839 | 435.4865 | -5.97 | 1.30E+03 |
| GalNAc-(dp13-7H-SO <sub>3</sub> ) <sup>6-</sup> | 494.9082 | 494.9093 | -2.22 | 5.31E+02 |
| GlcUA-(dp13-6H) <sup>6-</sup>                   | 490.4002 | 490.4014 | -2.45 | 3.00E+02 |
| (dp14-10H+2Na) <sup>8-</sup>                    | 408.5493 | 408.5497 | -0.98 | 6.10E+02 |
| (dp14-9H+Na) <sup>8-</sup>                      | 405.7997 | 405.8019 | -5.42 | 1.09E+03 |
| (dp14-7H+Na) <sup>6-</sup>                      | 541.4036 | 541.405  | -2.59 | 1.01E+03 |
| (dp14-8H+2Na) <sup>6-</sup>                     | 545.067  | 545.0687 | -3.12 | 7.54E+02 |
| (dp14-6H-SO <sub>3</sub> ) <sup>6-</sup>        | 524.4132 | 524.4152 | -3.81 | 1.52E+03 |

|   |          |          |       |          |
|---|----------|----------|-------|----------|
| (dp14-7H-SO <sub>3</sub> ) <sup>7-</sup>      | 449.3521 | 449.3549 | -6.23 | 1.02E+03 |
| (dp16-7H-SO <sub>3</sub> ) <sup>7-</sup>      | 514.9341 | 514.9361 | -3.88 | 1.11E+03 |
| (dp16-8H-SO <sub>3</sub> +Na) <sup>7-</sup>   | 518.0751 | 518.0763 | -2.32 | 5.74E+02 |
| (dp16-9H+2Na) <sup>7-</sup>                   | 532.6364 | 532.639  | -4.88 | 5.52E+02 |
| (dp16-8H+Na) <sup>7-</sup>                    | 529.4968 | 529.4987 | -3.59 | 7.90E+02 |
| (dp16-9H) <sup>9-</sup>                       | 409.1646 | 409.1661 | -3.67 | 9.86E+02 |
| (dp16-10H+Na) <sup>9-</sup>                   | 411.6077 | 411.6085 | -1.94 | 4.88E+02 |
| (dp18-8H-SO <sub>3</sub> ) <sup>8-</sup>      | 507.8249 | 507.8267 | -3.54 | 6.02E+02 |
| (dp18-9H-SO <sub>3</sub> +Na) <sup>8-</sup>   | 510.5722 | 510.5744 | -4.31 | 3.54E+02 |
| (dp18-11H+Na) <sup>10-</sup>                  | 416.253  | 416.2538 | -1.92 | 2.93E+02 |
| (dp18-10H-SO <sub>3</sub> +2Na) <sup>8-</sup> | 513.3314 | 513.3222 | 17.92 | 1.45E+03 |

Tableau A.12 : Affectations des ions observés dans le spectre ESI-Orbitrap du digestat CS-C

(Figure 16.B)

| Assignment                                     | Experimental <i>m/z</i> | Theoretical <i>m/z</i> | ppm error | Intensity |
|--|-------------------------|------------------------|-----------|-----------|
| (dp2-2H) <sup>2-</sup>                         | 237.5315                | 237.5321               | -2.53     | 1.36E+03  |
| GalNAc- (dp3-3H) <sup>3-</sup>                 | 252.3637                | 252.3644               | -2.77     | 2.03E+03  |
| GlcUA- (dp3-2H-H <sub>2</sub> O) <sup>2-</sup> | 316.5417                | 316.5429               | -3.79     | 1.24E+03  |
| (dp4-3H) <sup>3-</sup>                         | 311.0407                | 311.0418               | -3.54     | 4.71E+03  |
| (dp4-4H+Na) <sup>3-</sup>                      | 318.3672                | 318.3691               | -5.97     | 1.95E+02  |
| (dp4-2H+Na) <sup>1-</sup>                      | 957.1185                | 957.1218               | -3.45     | 2.07E+02  |
| GalNAc- (dp5-4H) <sup>4-</sup>                 | 303.7872                | 303.7885               | -4.28     | 6.75E+02  |
| (dp6-5H) <sup>5-</sup>                         | 278.035                 | 278.0358               | -2.88     | 5.19E+03  |
| (dp6-4H-SO <sub>3</sub> ) <sup>4-</sup>        | 327.8067                | 327.8074               | -2.14     | 2.00E+02  |
| (dp6-4H) <sup>4-</sup>                         | 347.7959                | 347.7966               | -2.01     | 1.89E+04  |
| (dp6-5H+Na) <sup>4-</sup>                      | 353.2901                | 353.2921               | -5.66     | 1.13E+03  |
| (dp6-3H) <sup>3-</sup>                         | 464.0614                | 464.0645               | -6.68     | 6.33E+03  |
| (dp6-2H-SO <sub>3</sub> ) <sup>2-</sup>        | 656.619                 | 656.622                | -4.57     | 297       |
| (dp6-3H+Na) <sup>2-</sup>                      | 707.5883                | 707.5914               | -4.38     | 2.44E+03  |
| (dp6-4H+2Na) <sup>2-</sup>                     | 718.5795                | 718.5824               | -4.04     | 5.77E+02  |
| (dp6-5H+3Na) <sup>2-</sup>                     | 729.5699                | 729.5733               | -4.66     | 2.50E+02  |
| GalNAc- (dp7-5H) <sup>5-</sup>                 | 334.6419                | 334.643                | -3.29     | 2.69E+02  |
| GlcUA- (dp7-3H) <sup>3-</sup>                  | 522.7394                | 522.7419               | -4.78     | 7.97E+02  |
| (dp8-6H) <sup>6-</sup>                         | 308.0392                | 308.0400               | -2.60     | 4.87E+03  |
| (dp8-7H+Na) <sup>6-</sup>                      | 311.7025                | 311.7037               | -3.85     | 5.75E+02  |
| (dp8-5H) <sup>5-</sup>                         | 369.8486                | 369.8495               | -2.43     | 1.21E+04  |
| (dp8-6H+Na) <sup>5-</sup>                      | 374.244                 | 374.2458               | -4.81     | 1.49E+03  |
| (dp8-4H) <sup>4-</sup>                         | 462.561                 | 462.5636               | -5.62     | 7.18E+03  |
| (dp8-3H-SO <sub>3</sub> ) <sup>3-</sup>        | 590.4327                | 590.435                | -3.90     | 7.93E+02  |

|  |          |          |       |          |
|--|----------|----------|-------|----------|
| (dp8-4H+Na) <sup>3-</sup>                | 624.4119 | 624.4146 | -4.32 | 2.92E+03 |
| (dp8-5H+2Na) <sup>3-</sup>               | 631.7394 | 631.7419 | -3.96 | 4.76E+02 |
| (dp8-6H+3Na) <sup>3-</sup>               | 639.067  | 639.0692 | -3.44 | 2.68E+02 |
| (dp8-7H+4Na) <sup>3-</sup>               | 646.3924 | 646.3965 | -6.34 | 8.80E+01 |
| (dp8-4H+2Na) <sup>2-</sup>               | 948.1126 | 948.1165 | -4.11 | 5.88E+02 |
| (dp8-5H+3Na) <sup>2-</sup>               | 959.1026 | 959.1075 | -5.11 | 2.75E+02 |
| GalNAc-(dp9-6H) <sup>6-</sup>            | 355.2119 | 355.2127 | -2.25 | 2.43E+02 |
| (dp10-7H) <sup>7-</sup>                  | 329.4704 | 329.4716 | -3.64 | 2.83E+03 |
| (dp10-8H+Na) <sup>7-</sup>               | 332.6104 | 332.6118 | -4.21 | 5.87E+02 |
| (dp10-6H) <sup>6-</sup>                  | 384.5503 | 384.5514 | -2.86 | 6.43E+03 |
| (dp10-7H+Na) <sup>6-</sup>               | 388.2125 | 388.215  | -6.44 | 1.57E+03 |
| (dp10-8H+2Na) <sup>6-</sup>              | 391.8768 | 391.8787 | -4.85 | 7.09E+02 |
| (dp10-5H) <sup>5-</sup>                  | 461.6602 | 461.6631 | -6.28 | 5.82E+03 |
| (dp10-6H+Na) <sup>5-</sup>               | 466.0557 | 466.0595 | -8.15 | 1.39E+03 |
| (dp10-5H+Na) <sup>4-</sup>               | 582.8237 | 582.8262 | -4.29 | 2.65E+03 |
| (dp10-6H+2Na) <sup>4-</sup>              | 588.3188 | 588.3217 | -4.93 | 5.68E+02 |
| (dp10-8H+4Na) <sup>4-</sup>              | 599.3102 | 599.3127 | -4.17 | 1.66E+02 |
| (dp10-4H-SO <sub>3</sub> ) <sup>4-</sup> | 557.3392 | 557.3415 | -4.13 | 8.45E+02 |
| (dp10-5H+2Na) <sup>3-</sup>              | 784.7617 | 784.7647 | -3.82 | 6.69E+02 |
| (dp10-6H+3Na) <sup>3-</sup>              | 792.0896 | 792.092  | -3.03 | 1.61E+02 |
| GalNAc-(dp11-8H) <sup>8-</sup>           | 323.5401 | 323.5412 | -3.40 | 2.50E+01 |
| (dp12-8H) <sup>8-</sup>                  | 345.544  | 345.5453 | -3.76 | 1.13E+03 |
| (dp12-7H) <sup>7-</sup>                  | 395.0508 | 395.0528 | -5.06 | 3.26E+03 |
| (dp12-8H+Na) <sup>7-</sup>               | 398.1913 | 398.193  | -4.27 | 1.20E+03 |
| (dp12-9H+2Na) <sup>7-</sup>              | 401.3309 | 401.3333 | -5.98 | 5.31E+02 |
| (dp12-10H+3Na) <sup>7-</sup>             | 404.4726 | 404.4736 | -2.47 | 2.92E+02 |
| (dp12-6H) <sup>6-</sup>                  | 461.0617 | 461.0628 | -2.39 | 1.13E+04 |
| (dp12-5H-SO <sub>3</sub> ) <sub>5-</sub> | 537.4831 | 537.4854 | -4.28 | 8.97E+02 |
| (dp12-6H+Na) <sub>5-</sub>               | 557.8709 | 557.8732 | -4.12 | 1.88E+03 |
| (dp12-7H+2Na) <sub>5-</sub>              | 562.2666 | 562.2695 | -5.16 | 3.72E+02 |
| (dp12-8H+3Na) <sub>5-</sub>              | 566.6629 | 566.6659 | -5.29 | 3.20E+02 |
| (dp12-6H+2Na) <sub>4-</sub>              | 703.0858 | 703.0877 | -2.70 | 8.61E+02 |
| (dp12-6H+3Na) <sub>3-</sub>              | 945.1118 | 945.1147 | -3.07 | 1.52E+02 |
| GlcUA-(dp13-6H) <sub>6-</sub>            | 490.3987 | 490.4014 | -5.51 | 4.36E+02 |
| (dp14-9H) <sub>9-</sub>                  | 358.1574 | 358.1585 | -3.07 | 7.71E+02 |
| (dp14-10H+Na) <sub>9-</sub>              | 360.5996 | 360.6009 | -3.61 | 3.76E+02 |
| (dp14-11H+2Na) <sub>9-</sub>             | 363.0434 | 363.0434 | 0.00  | 1.92E+02 |
| (dp14-12H+3Na) <sub>9-</sub>             | 365.4844 | 365.4858 | -3.83 | 5.50E+01 |
| (dp14-8H) <sub>8-</sub>                  | 403.0516 | 403.0542 | -6.45 | 1.77E+03 |
| (dp14-9H+Na) <sub>8-</sub>               | 405.7991 | 405.8019 | -6.90 | 8.83E+02 |
| (dp14-10H+2Na) <sub>8-</sub>             | 408.5492 | 408.5497 | -1.22 | 4.30E+02 |
| (dp14-7H) <sup>7-</sup>                  | 460.7739 | 460.7773 | -7.38 | 3.39E+03 |

|                          |          |          |       |          |
|--------------------------|----------|----------|-------|----------|
| $(dp14-6H-SO_3)^{6-}$    | 524.4125 | 524.4152 | -5.15 | 1.01E+03 |
| $(dp14-7H+Na)^{6-}$      | 541.4022 | 541.405  | -5.17 | 1.58E+03 |
| $(dp14-8H+2Na)^{6-}$     | 545.0661 | 545.0687 | -4.77 | 3.56E+02 |
| $(dp14-6H-SO_3+Na)^{5-}$ | 633.8937 | 633.8961 | -3.79 | 1.76E+02 |
| $(dp14-6H+1Na)^{5-}$     | 649.8847 | 649.8875 | -4.31 | 3.51E+02 |
| $(dp14-7H+2Na)^{5-}$     | 654.2805 | 654.2839 | -5.20 | 6.54E+02 |
| $(dp14-7H+3Na)^{4-}$     | 823.5981 | 823.6021 | -4.86 | 2.59E+02 |
| $(dp16-9H)^{9-}$         | 409.1636 | 409.1661 | -6.11 | 1.40E+03 |
| $(dp16-10H+Na)^{9-}$     | 411.6068 | 411.6085 | -4.13 | 6.68E+02 |
| $(dp16-7H-SO_3)^{7-}$    | 514.9333 | 514.9361 | -5.44 | 1.14E+03 |
| $(dp16-8H-SO_3+Na)^{7-}$ | 518.0786 | 518.0763 | 4.44  | 5.68E+02 |
| $(dp16-8H+Na)^{7-}$      | 529.4955 | 529.4987 | -6.04 | 1.31E+03 |
| $(dp16-9H+2Na)^{7-}$     | 532.6361 | 532.639  | -5.44 | 2.78E+02 |
| $(dp16-7H+1Na)^{6-}$     | 617.9136 | 617.9164 | -4.53 | 2.35E+02 |
| $(dp16-8H+2Na)^{6-}$     | 621.5774 | 621.5801 | -4.34 | 4.97E+02 |
| $(dp18-11H+Na)^{10-}$    | 416.2513 | 416.2538 | -6.01 | 4.77E+02 |
| $(dp18-8H-SO_3)^{8-}$    | 507.8238 | 507.8267 | -5.71 | 1.15E+03 |
| $(dp18-9H+Na)^{8-}$      | 520.5669 | 520.569  | -4.03 | 9.69E+02 |
| $(dp20-9H-SO_3)^{9-}$    | 502.2943 | 502.2972 | -5.77 | 1.09E+03 |
| $(dp20-10H+Na)^{9-}$     | 513.6214 | 513.6237 | -4.48 | 6.42E+02 |
| $(dp20-9H+Na-SO_3)^{8-}$ | 567.9552 | 567.9579 | -4.75 | 2.22E+02 |

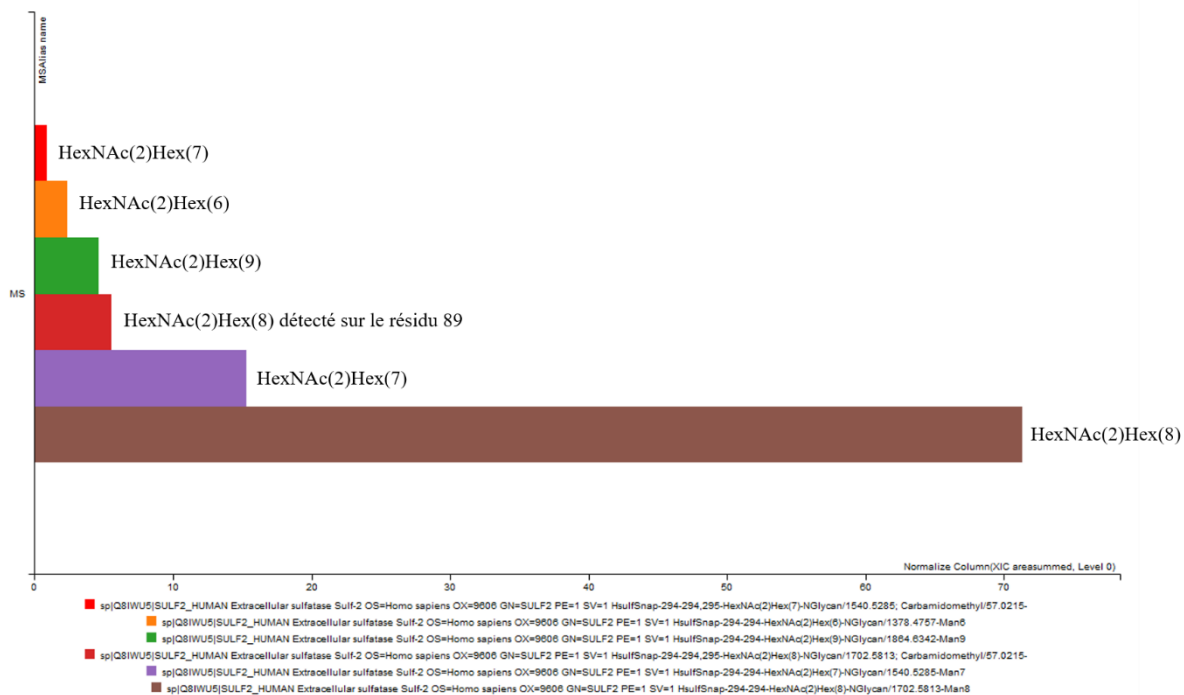


Figure A.46: Abondance relative des différentes structures de *N*-glycane présentes sur la position N88 calculée par le logiciel Byonic

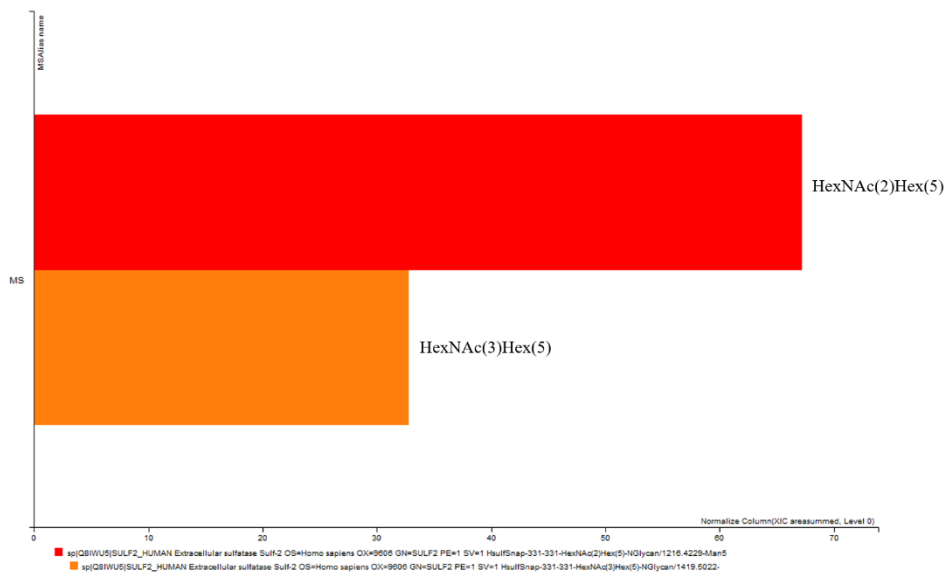
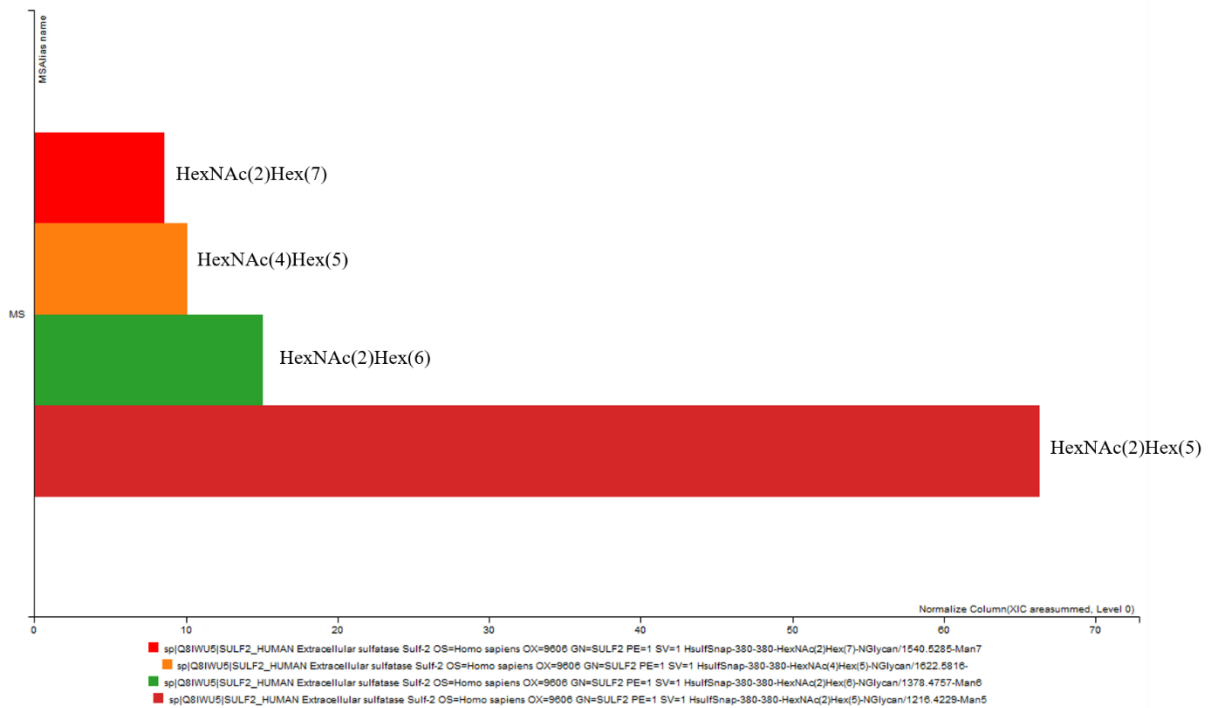
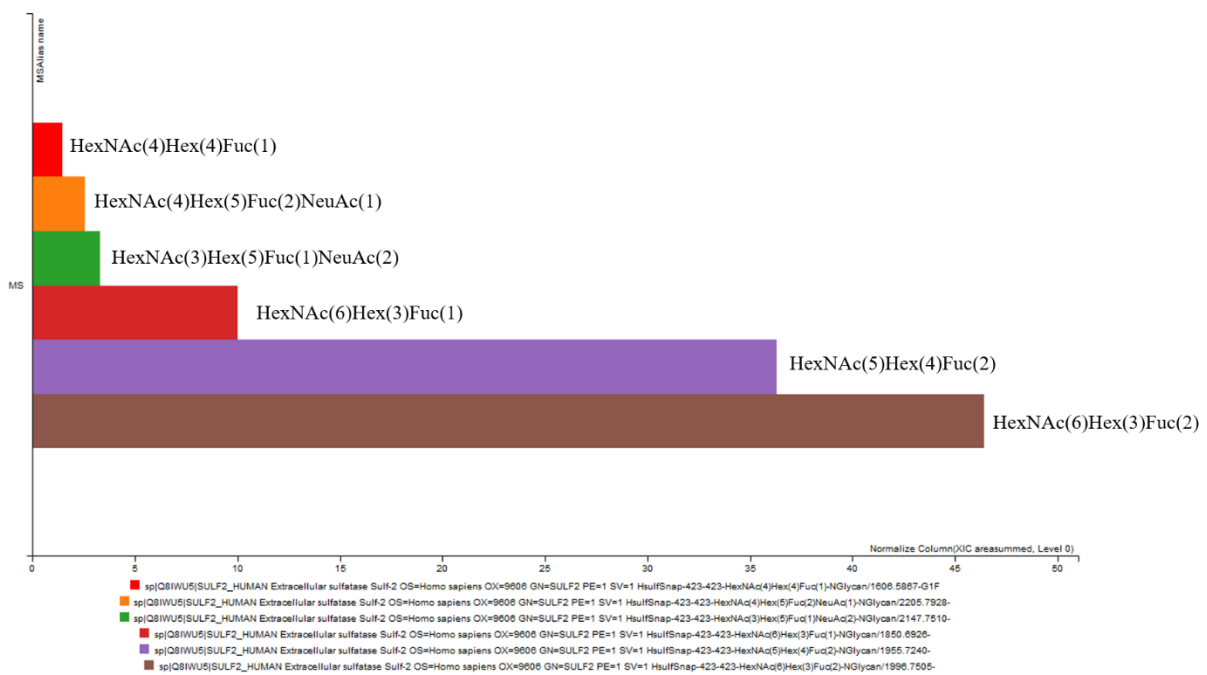


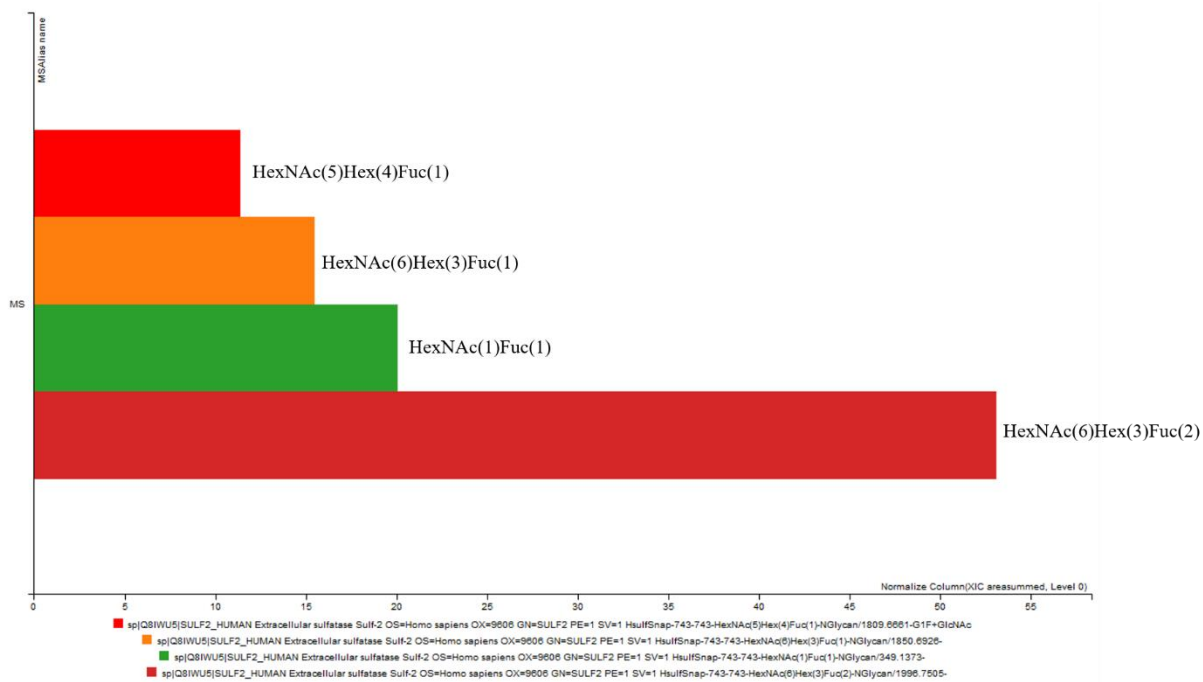
Figure A.47 : Abondance relative des différentes structures de *N*-glycane présentes sur la position N125 calculée par le logiciel Byonic.



**Figure A.48 : Abondance relative des différentes structures de *N*-glycanes présentes sur la position N174 calculée par le logiciel Byonic.**



**Figure A.49 : Abondance relative des différentes structures de *N*-glycanes présentes sur la position N217 calculée par le logiciel Byonic.**



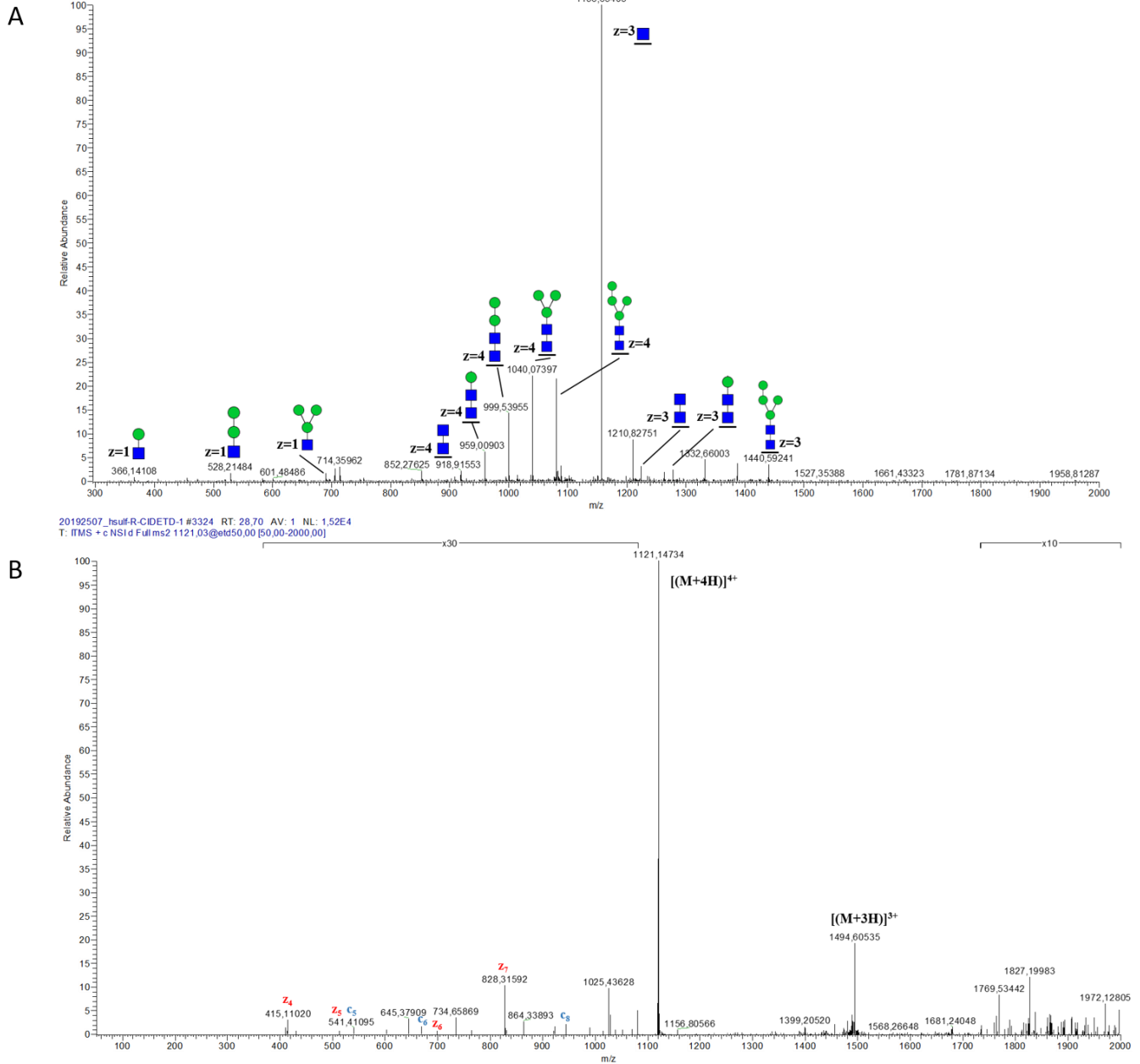
**Figure A.50 : Abondance relative des différentes structures de *N*-glycanes présentes sur la position N537 calculée par le logiciel Byonic.**



— peptide (T<sub>114</sub>AFFGKYLNEYN\*GSYVPPGWKEWVGLLK<sub>141</sub>)  
 ■ N-Acetylglucosamine (GlcNAc) 203 Da  
 ● Mannose (Man) 162 Da

N 125

T<sub>114</sub>AFFGKYLNEYN\*GSYVPPGWKEWVGLLK<sub>141</sub>



**Figure A.51 : Spectres nanoLC-ESI-MS-MS de l'ion précurseur à m/z 1121.03, glycopeptide portant l'asparagine N125. (A) fragmentation CID en mode positif avec énergie de collision normalisée à 35% ; (B) fragmentation ETD en mode positif, avec le fluoranthène, ECN à 40%**

— peptide (EKHGSDYSKDYLTDLITN\*DSVSFFR)

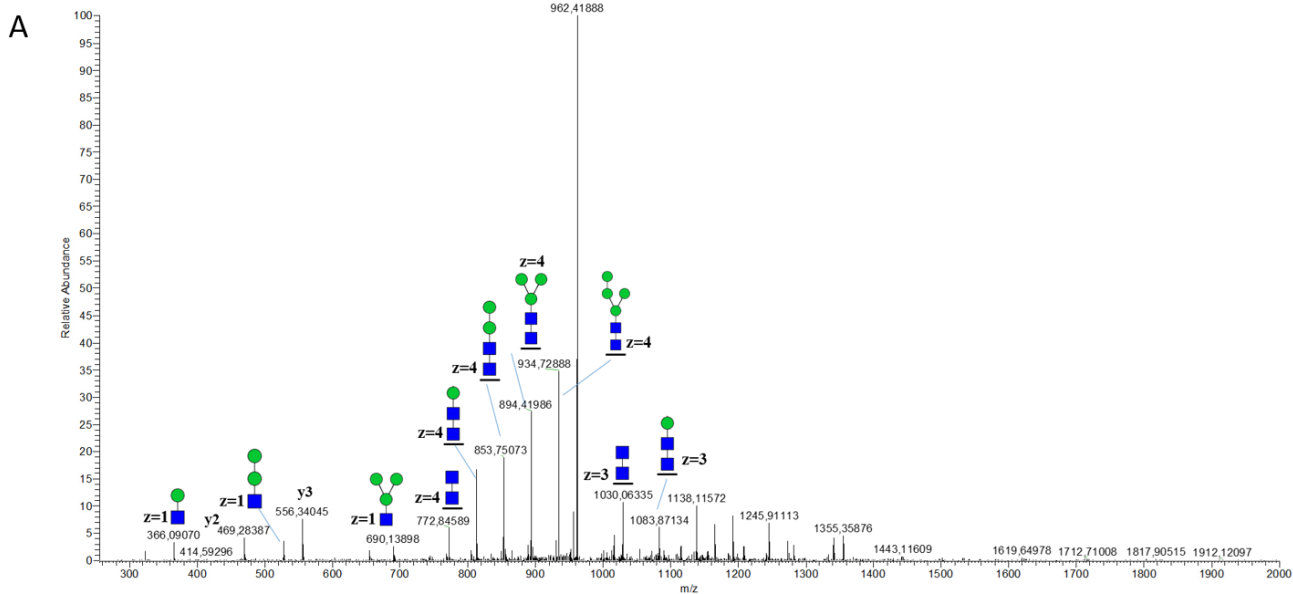
■ N-Acetylglucosamine (GlcNAc) 203 Da

● Mannose (Man) 162 Da

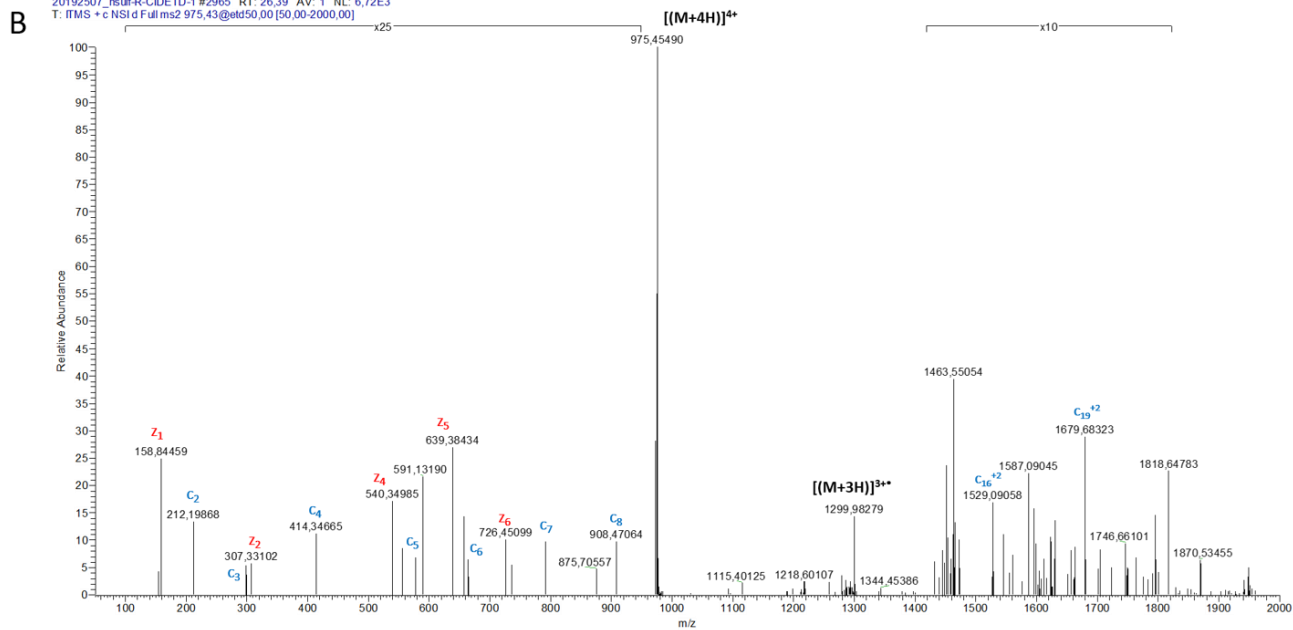
N 174

H<sub>159</sub>GSDYSKDYLTDLITNDSVSFFR<sub>181</sub>

20192507\_hsuIFR-CIDETD-1 #2964 RT: 26.39 AV: 1 NL: 7.24E4  
T: ITMS + c NSI d Full ms2 975.43@cid35,00 [255,00-2000,00]



20192507\_hsuIFR-CIDETD-1 #2965 RT: 26.39 AV: 1 NL: 6.72E3  
T: ITMS + c NSI d Full ms2 975.43@etd50,00 [50,00-2000,00]

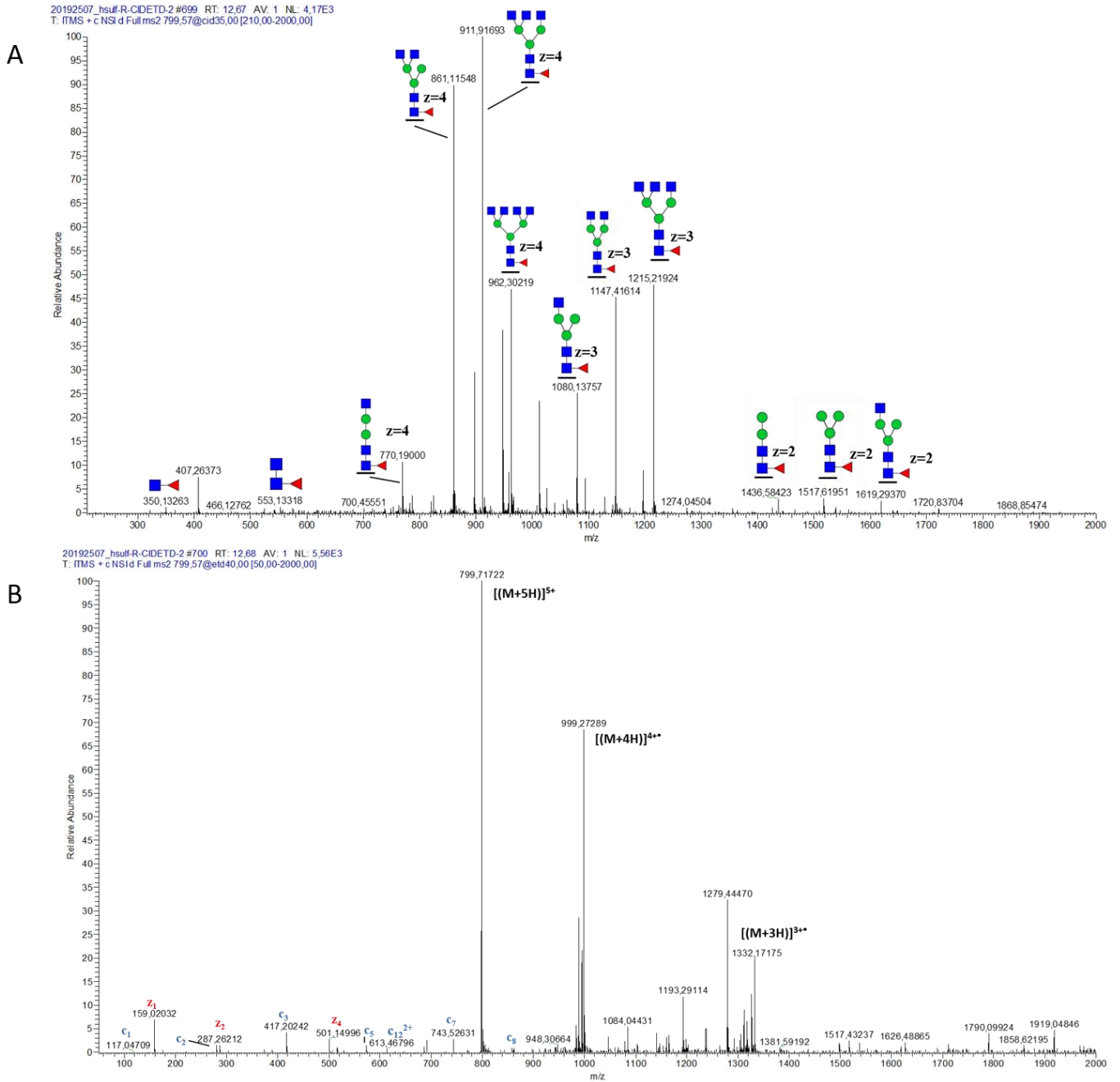


**Figure A.52 : Spectres nanoLC-ESI-MS-MS de l'ion précurseur à m/z 975.43, glycopeptide portant l'asparagine N174. (A) fragmentation CID en mode positif avec énergie de collision normalisée à 35% ; (B) fragmentation ETD en mode positif, avec le fluoranthène, ECN à 40%.**

— peptide (V<sub>524</sub>YHVGLGDAAQPRN\*LTKR<sub>541</sub>)  
 ■ N-Acetylglucosamine (GlcNAc) 203 Da  
 ● Mannose (Man) 162 Da  
 ▲ Fucose (Fuc) 146 Da

N 537

V<sub>524</sub>YHVGLGDAAQPRN\*LTKR<sub>541</sub>



**Figure A.53 : Spectres nanoLC-ESI-MS-MS de l'ion précurseur à m/z 799.57, glycopeptide portant l'asparagine N537. (A) fragmentation CID en mode positif avec énergie de collision normalisée à 35% ; (B) fragmentation ETD en mode positif, avec le fluoranthène, ECN à 40%.**

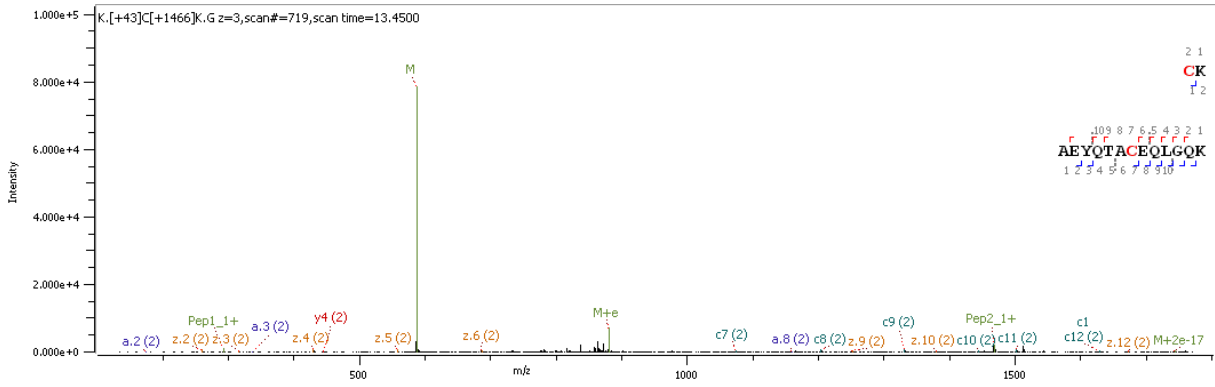


Figure A.54 : Spectre ETD de HSulf-2 digérée en conditions non réductrices montrant les peptides C\*K et AEYQTAC\*EQLGQK contenant les résidus de cystéines C453 et C431 reliés par un pont disulfure. M= [(M+3H)]<sup>3+</sup>

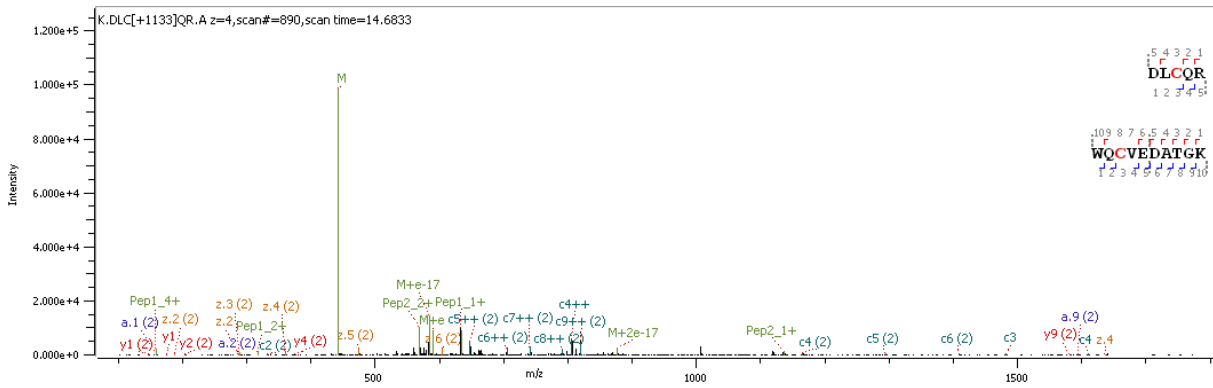


Figure A.55 : Spectre ETD de HSulf-2 digérée en conditions non réductrices montrant les peptides DLC\*QR et WQC\*VEDATGK contenant les résidus de cystéines C422 et C440 reliés par un pont disulfure. M= [(M+4H)]<sup>4+</sup>

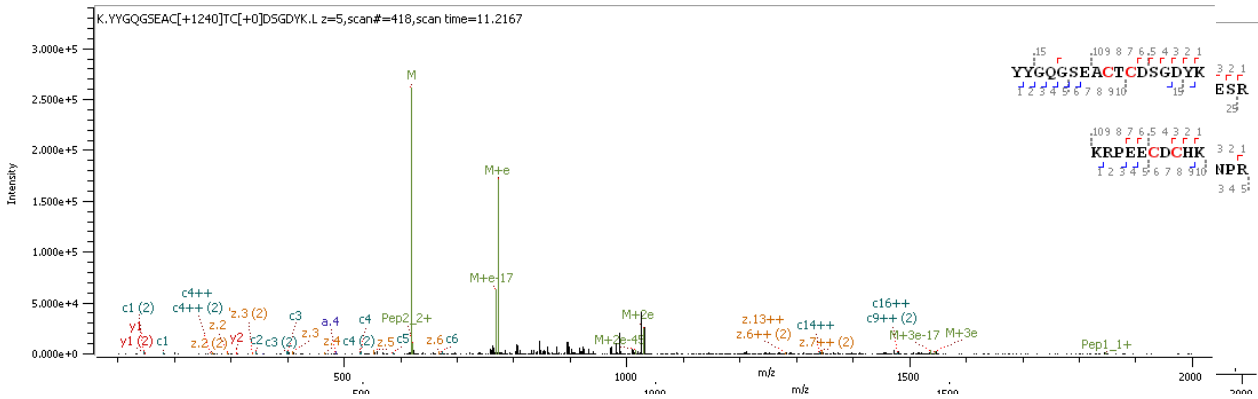


Figure A.57 : Spectre ETD de HSulf-2 digérée en conditions non réductrices montrant les peptides YYGQGSEAC\*TC\*DSGDYK et KRPEEC\*DC\*H contenant les résidus de cystéines C480/C482 et C636/C638 reliés par des ponts disulfures. M= [(M+5H)]<sup>5+</sup>

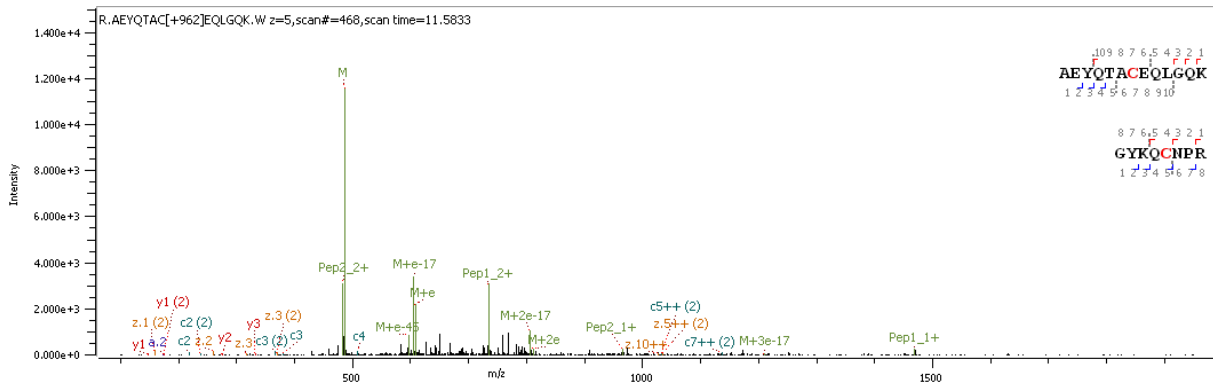
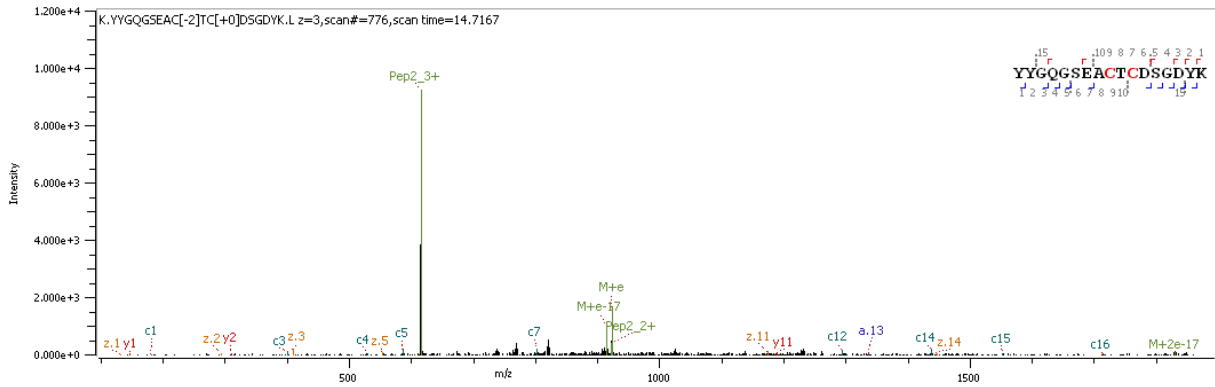
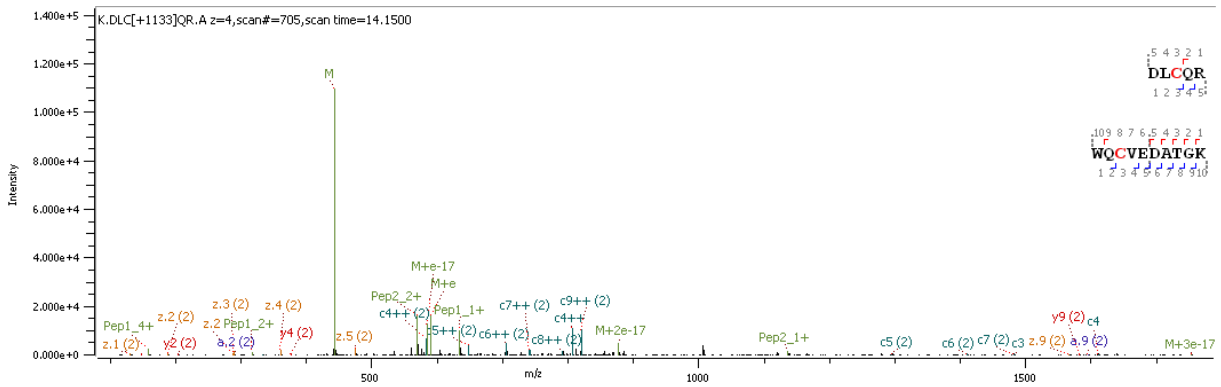


Figure A.58 : Spectre ETD de HSulf-2 digérée en conditions non réductrices montrant les peptides AEYQTAC\*EQLGQK et GYKQC\*NPR contenant les résidus de cystéines C431 et C798 reliés par un pont disulfure. M= [(M+5H)]<sup>5+</sup>



**Figure A.59 :** Spectre ETD du domaine HD isolé digéré en conditions non réductrices montrant le peptide YYQGSEAC\*TC\*DSGDYK contenant les résidus de cystéines C636 et C638 relié par un pont disulfure intrapeptide.  $M = [(M+3H)]^{3+}$



**Figure A.60 :** Spectre ETD du domaine HD isolé digéré en conditions non réductrices montrant les peptides DLC\*QR et WQC\*VEDATGK contenant les résidus de cystéines C422 et C440 reliés par un pont disulfure.  $M = [(M+4H)]^{4+}$

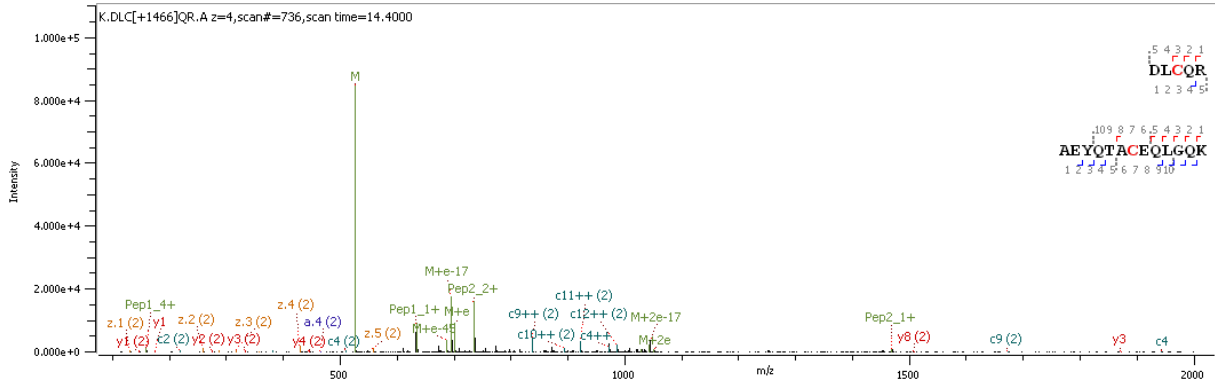


Figure A.62 : Spectre ETD du domaine HD isolé digéré en conditions non réductrices montrant les peptides DLC\*QR et AEYQTAC\*QLGQK contenant les résidus de cystéines C422 et C431 reliés par un pont disulfure. M= [(M+4H)]<sup>4+</sup>

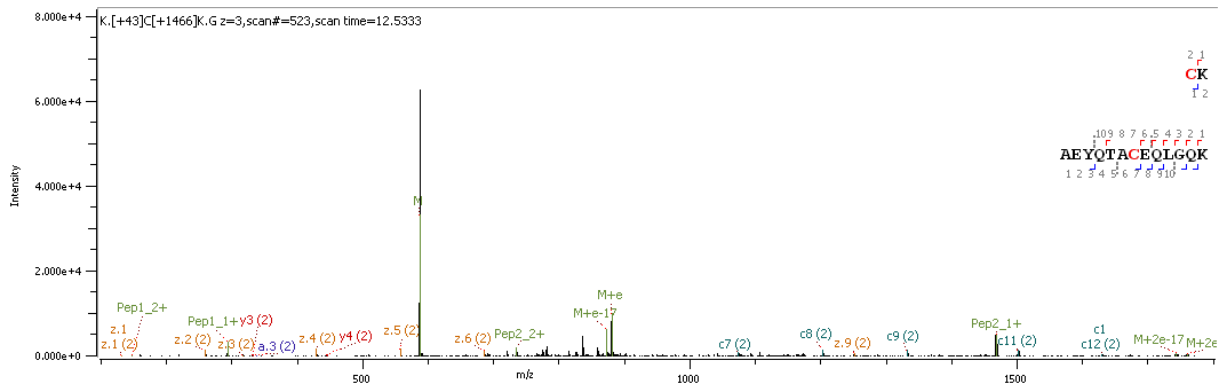


Figure A.61 : Spectre ETD du domaine HD isolé digéré en conditions non réductrices montrant les peptides C\*K et AEYQTAC\*QLGQK contenant les résidus de cystéines C453 et C431 reliés par un pont disulfure. M= [(M+3H)]<sup>3+</sup>

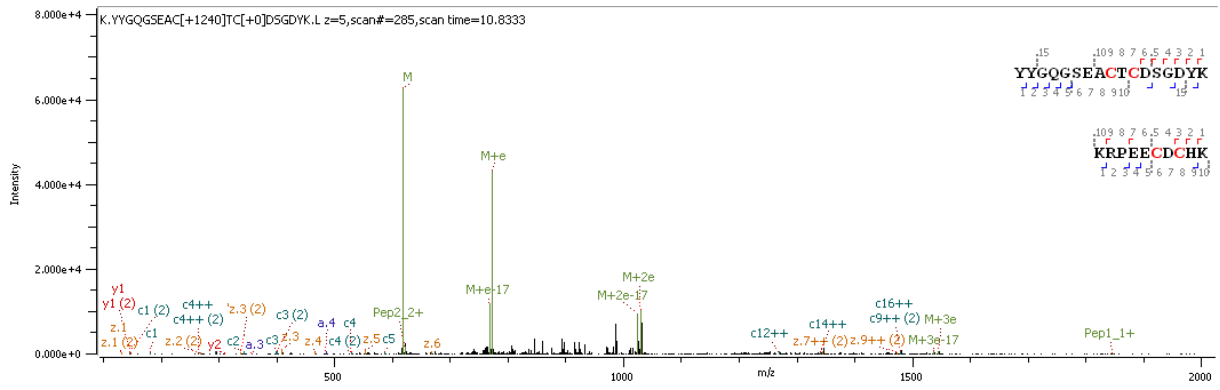


Figure A.63 : Spectre ETD du domaine HD isolé digéré en conditions non réductrices montrant les peptides **YYGQGSEAC\*TC\*DSGDYK** et **KRPEEC\*DC\*HK** contenant les résidus de cystéines C480/C482 et C636/C638 reliés par des ponts disulfures.  $M = [(M+5H)]^{5+}$



## **Publications**

Analytical Glycobiology

# Mammal hyaluronidase activity on chondroitin sulfate and dermatan sulfate: Mass spectrometry analysis of oligosaccharide products

Mélanie Bilong<sup>2</sup>, Parisa Bayat<sup>2</sup>, Matthieu Bourderioux<sup>2</sup>,  
Murielle Jérôme<sup>2</sup>, Alexandre Giuliani<sup>3,4</sup> and Régis Daniel<sup>1,2</sup>

<sup>2</sup>Université Paris-Saclay, Univ Evry, CNRS, LAMBE, 91025 Evry-Courcouronnes, France, <sup>3</sup>SOLEIL, l'Orme des Merisiers, St Aubin, BP48, 91192 Gif sur Yvette Cedex, France, and <sup>4</sup>UAR1008, Transform, INRAe, Rue de la Géraudière, 44316 Nantes, France

<sup>1</sup>To whom correspondence should be addressed: e-mail: regis.daniel@univ-evry.fr

Received 9 November 2020; Revised 28 December 2020; Accepted 28 December 2020

## Abstract

Mammalian hyaluronidases are endo-*N*-acetyl-D-hexosaminidases involved in the catabolism of hyaluronic acid (HA) but their role in the catabolism of chondroitin sulfate (CS) is also examined. HA and CS are glycosaminoglycans implicated in several physiological and pathological processes, and understanding their metabolism is of significant importance. Data have been previously reported on the degradation of CS under the action of hyaluronidase, yet a detailed structural investigation of CS depolymerization products remains necessary to improve our knowledge of the CS depolymerizing activity of hyaluronidase. For that purpose, the fine structural characterization of CS oligosaccharides formed upon the enzymatic depolymerization of various CS subtypes by hyaluronidase has been carried out by high-resolution Orbitrap mass spectrometry (MS) and extreme UV (XUV) photodissociation tandem MS. The exact mass measurements show the formation of wide size range of even oligosaccharides upon digestion of CS-A and CS-C comprising hexa- and octa-saccharides among the main digestion products, as well as formation of small quantities of odd-numbered oligosaccharides, while no hyaluronidase activity was detected on CS-B. In addition, slight differences have been observed in the distribution of oligosaccharides in the digestion mixture of CS-A and CS-C, the contribution of longer oligosaccharides being significantly higher for CS-C. The sequence of CS oligosaccharide products determined XUV photodissociation experiments verifies the selective  $\beta(1 \rightarrow 4)$  glycosidic bond cleavage catalyzed by mammal hyaluronidase. The ability of the mammal hyaluronidase to produce hexa- and higher oligosaccharides supports its role in the catabolism of CS anchored to membrane proteoglycans and in extra-cellular matrix.

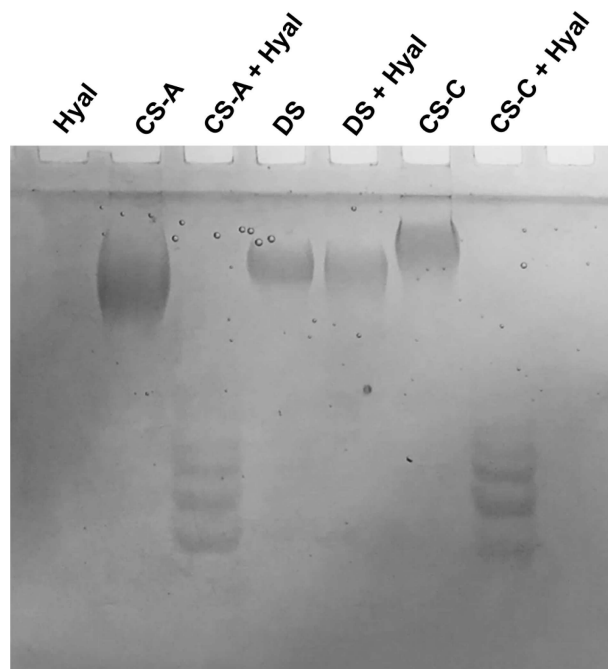
**Key words:** chondroitin sulfate, extreme UV photodissociation, glycosaminoglycan, hyaluronidase

## Introduction

Defects in the catabolism of glycosaminoglycans (GAGs) and their subsequent accumulation within biological matrices and tissues are associated with several pathological states and diseases. GAGs are a family of linear polysaccharides present on the cell surfaces and in the extracellular matrix, which play important roles in the interaction between cells and matrix, and are involved in a wide variety of biological processes such as cell proliferation, differentiation and migration (Jackson et al. 1991; Sugahara et al. 2003). The GAGs chondroitin sulfate (CS) and hyaluronic acid (HA) are involved in cartilage pathologies (Schiller et al. 1996). In rheumatic diseases, CS and HA oligosaccharide chains accumulate in synovial fluids causing joint inflammation (Schiller et al. 1996). For this reason and also the implication in other biological processes, understanding their metabolism is of great importance.

CS and HA have distinct catabolism depending on their structure. CS consists of a repeating disaccharide unit of  $-4\text{GlcUA}\beta 1-3\text{GalNAc}\beta 1-$  (GlcUA = D-glucuronic acid and GalNAc = N-acetyl-D-galactosamine), which can be sulfated at one or multiple positions as follows: O-sulfation at C2 on GlcUA, and 4/6 positions on GalNAc. Therefore, different combinations of above-mentioned possibilities can occur leading to the following CS families: CS-A (GlcUA-GalNAc(4S)), CS-C (GlcUA-GalNAc(6S)), CS-D (GlcUA(2S)-GalNAc(6S)), CS-E (GlcUA-GalNAc(4S,6S)) and CS-T (GlcUA(2S)-GalNAc(4S,6S)), where 2S, 4S and 6S represent 2-O-, 4-O- and 6-O-sulfations, respectively (Farrugia et al. 2019). In addition to sulfation, epimerization of the C6 carboxyl group converts GlcUA into L-iduronic acid (IdoA) resulting in CS-B (IdoA-GalNAc(4S)) also known as dermatan sulfate (DS). The cellular degradation of CS is known to occur in lysosomes; however, its exact mechanisms at early stage of catabolism, which might involve exo/endopolysaccharidases, are still poorly understood. HA consists of a repeating disaccharide unit of  $-4\text{GlcUA}\beta 1-3\text{GlcNAc}\beta 1-$  (GlcNAc = N-acetyl-D-glucosamine). Unlike CS catabolism, the physiological depolymerization of HA is known to be mediated by different hyaluronidase enzymes (EC 3.2.1.35) (Meyer and Rapport 1952; Csoka et al. 2001; Stern 2003; Necas et al. 2008; Wang et al. 2016). Given the same  $\beta$ -glycosidic linkages in CS and HA backbones sharing the repeating disaccharide unit  $-4\text{uronic acid}\beta 1-3\text{ N-acetylhexosamine}\beta 1-$ , the role of the hyaluronidases in CS catabolism has been previously examined (Honda et al. 2012; Yamada 2015). The human hyaluronidase-4 has been shown active in vivo on CS with enzyme activity depending on CS structures (Stern and Jdrzejcas 2006; Kaneiwa et al. 2010; Yamada 2012, 2015; Farrugia et al. 2019).

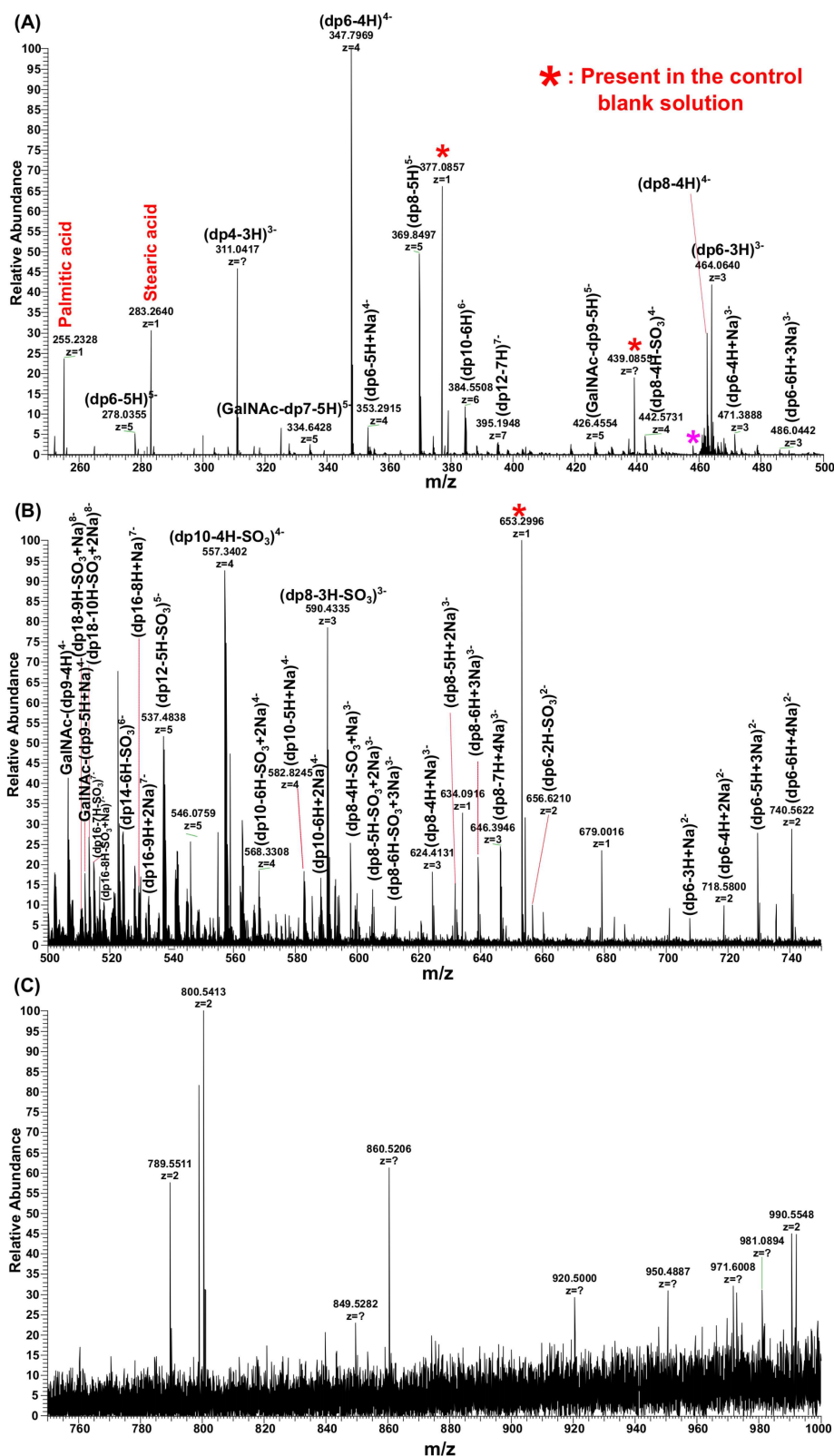
NMR studies of degradation products from CS and HA in synovial fluid has been previously reported, but the characterization of oligosaccharide structures were difficult due to broad and overlapping signals in NMR spectra (Schiller et al. 1996). Atmospheric pressure ionization mass spectrometry (MS) has been employed to monitor the products of the reaction between HA oligosaccharides and bovine testicular hyaluronidase (Takagaki et al. 1994), and matrix assisted laser desorption ionization (MALDI) MS has been also used to analyze the depolymerization of crude HA and CS by testicular hyaluronidase and to investigate the degradation products of nasal cartilage (Schiller et al. 1999). This later study showed the ability of hyaluronidase to catalyze the depolymerization of CS. However, in absence of tandem MS (MS/MS), it did not provide an accurate structural determination of the formed CS oligosaccharides. More recently the human hyaluronidase-4 activity on CS have been studied by steric and ion exchange chromatography, showing



**Fig. 1.** C-PAGE profile of intact CS-A, DS and CS-C and their corresponding digests. Digestion was performed by incubation of 6  $\mu\text{g}$  of each individual polysaccharide with 6  $\mu\text{L}$  of 1000 u/mL Hyal at 37°C overnight, 27% polyacrylamide gel electrophoresis, double staining by Alcian blue and silver nitrate. This figure is available in black and white in print and in color at *Glycobiology* online.

endopolysaccharidase activity on CS in mammals (Kaneiwa et al. 2010). It showed preferential depolymerization of CS-D, then CS-C and CS-A substrates among the different CS families, as well as regioselectivity of the glycosidic cleavage (Kaneiwa et al. 2010). However, sparse structural data were provided on the sulfated sequences of CS oligosaccharides formed by hyaluronidase.

Advent of electrospray ionization-MS (ESI-MS) with maximal conservation of the labile sulfate groups in the gas phase, and also the development of a wide variety of fragmentation techniques (Bayat et al. 2020; Pepi et al. 2020) fostered significant advancement in the structural elucidation of GAGs (Naggar et al. 2004; Chi et al. 2005; Laremore et al. 2009; Zaia 2013; Kubaski et al. 2017; Minsky et al. 2018; Solakyildirim 2019). Among various tandem MS techniques that have been employed for the analysis of GAGs, collision-induced dissociation (CID) (Zaia et al. 2001, 2003; Zaia and Costello 2003; Ly et al. 2011), infrared multiphoton dissociation (Wolff et al. 2008b; Leach, Xiao, et al. 2011; Schindler et al. 2017; Lettow et al. 2020), electron detachment dissociation (Wolff et al. 2007, 2008b, 2008a; Leach, Xiao, et al. 2011; Leach, Wolff, et al. 2011; Leach, Arungundram, et al. 2012; Leach, Ly, et al. 2012; Kailemia et al. 2014; Agyekum et al. 2015), negative electron transfer dissociation (Wolff et al. 2010; Leach, Xiao, et al. 2011; Leach, Wolff, et al. 2011; Leach et al. 2017; Wu et al. 2018; Wei et al. 2019) and ultraviolet photodissociation (UVPD) (Racaud et al. 2009; Klein et al. 2019) can be mentioned. Recently, extreme UV (XUV) photodissociation tandem MS was introduced that allows producing a substantially informative fragmentation pattern compared to the classical tandem MS techniques (Ropartz et al. 2014, 2015). In the study herein, we report the fine structural characterization of



**Fig. 2.** Negative ion mode ESI-Orbitrap mass spectrum of the CS-A digest. To have a better view of the observed ions, different regions of the spectrum are separately shown as follows: (A)  $m/z$  250–500, (B)  $m/z$  500–750 and (C)  $m/z$  750–1000 ranges. Ions indicated by red stars have been present in the control solution containing only the enzyme without substrate; ion indicated by a pink star has been present in the control solution containing only the substrate in the absence of the enzyme; no ion was identified in the  $m/z$  750–1000 range (C). (D) Absolute intensities of the different oligosaccharides observed in the ESI-Orbitrap mass spectrum of the CS-A digest plotted according to their size, taking into account all the charge states for each oligosaccharide. For each individual ion, only the intensity of the monoisotopic peak was counted. Digestion was performed by incubation of 0.2 mg of CS-A with 20  $\mu$ L of Hyal (1000 u/mL) at 37°C overnight. Direct infusion (3  $\mu$ L/min) of the digestion mixture diluted in methanol. This figure is available in black and white in print and in color at *Glycobiology* online.

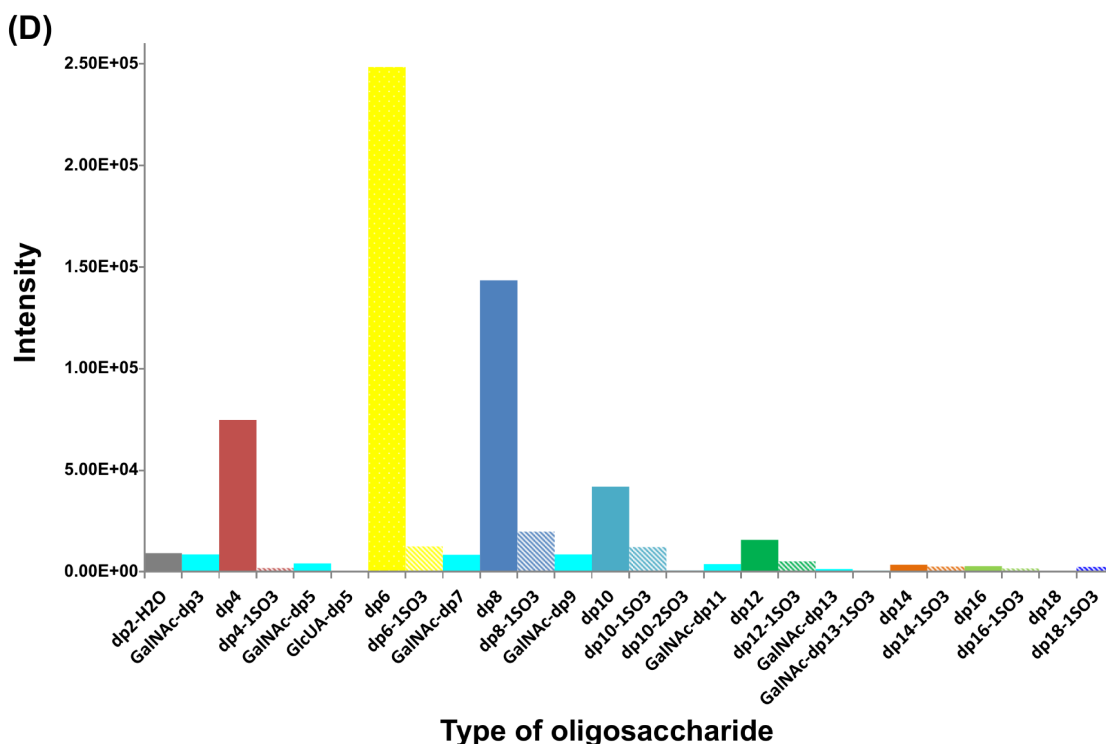


Fig. 2. continued

CS oligosaccharides formed upon the enzyme depolymerization of CS by mammal hyaluronidase (sheep testes, EC 3.2.35) by using ESI-MS and XUV photodissociation without prior derivatization. Size distribution and sulfate patterns were determined, establishing the structure of CS oligosaccharides formed by hyaluronidase and improving our current knowledge about the catabolism of CS by hyaluronidase.

## Materials and methods

### Chemicals

The following materials were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France): chondroitin sulfate CS-A from bovine trachea (C-8529, ~70% purity), CS-C from shark cartilage (C4384, ~90% purity), DS from porcine intestinal mucosa (C-3788, ≥90% purity), hyaluronidase (hyaluronate 4-glycanohydrolase 380 u/mg) from sheep testes (H2126), methanol, acetonitrile, acetic acid, formaldehyde (≥36%), Alcian blue 8GX and silver nitrate. Ultra-pure water (18.2 MΩ) was obtained from a Milli-Q purification system (Millipore). Rotiphorese 40% acrylamide/bisacrylamide (29:1) solution was obtained from Roth (Karlsruhe/Germany). Bio-Gel P-10 was purchased from Bio-Rad (Marnes-la-Coquette).

### Depolymerization by mammal hyaluronidase

Enzyme digestion was performed in the reaction buffer 20 mM sodium phosphate, 77 mM NaCl, pH 7, containing CS/DS at a concentration adjusted according to the subsequent analytical method. The reaction was initiated by addition of hyaluronidase (Hyal, 1000 u/mL). After overnight incubation at 37°C, digestion was stopped by heating the samples at 95°C for 5 min.

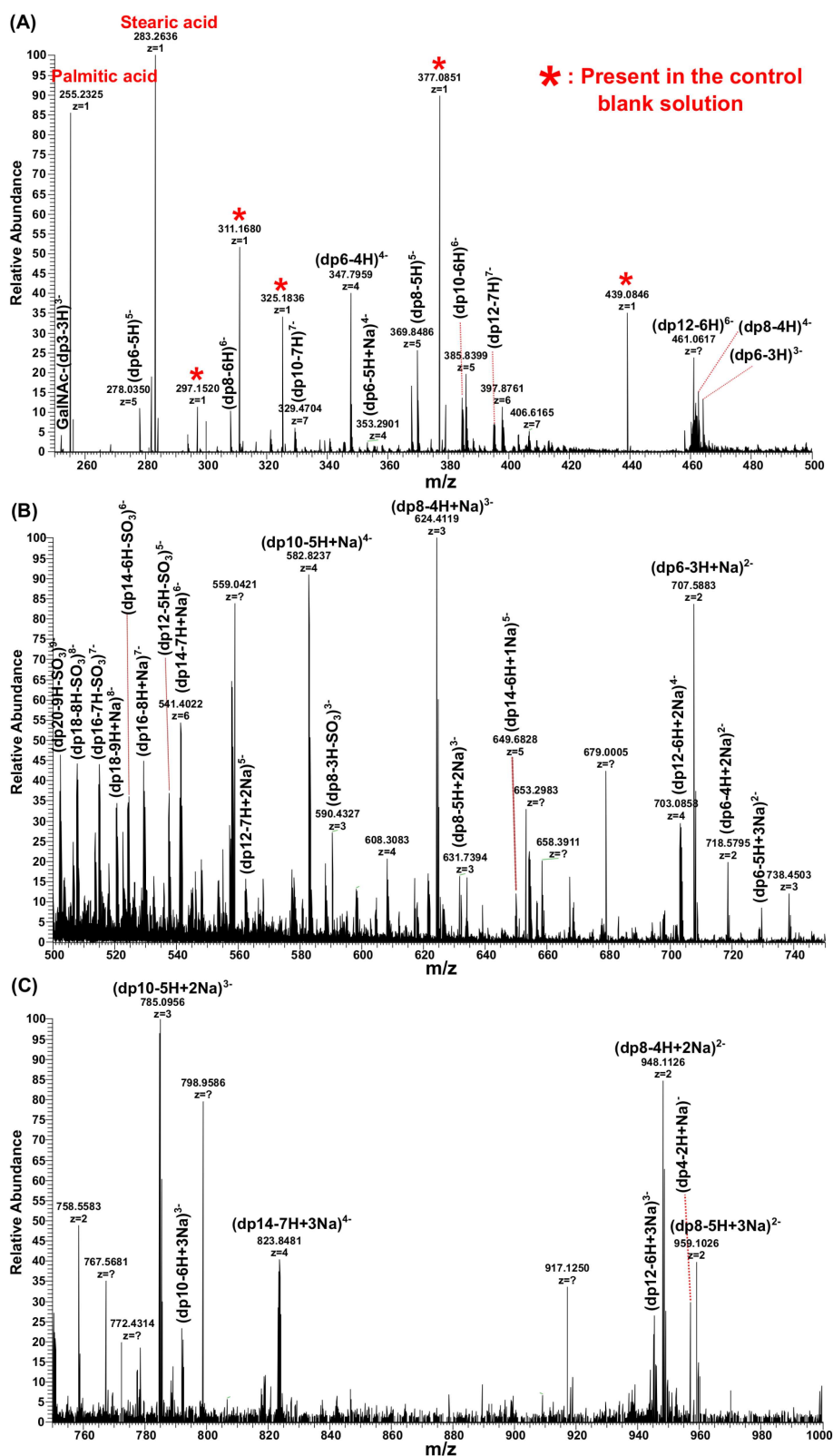
For MS analysis, 25 µL of 0.8 mg/mL CS/DS stock solution in water was diluted in 50 µL reaction buffer. Enzyme digestion was initiated by addition of 20 µL of Hyal (1000 u/mL). After overnight incubation and stopping reaction by heating, the reaction mixtures were centrifuged at 15,000 rpm for 10 min, and supernatants were collected for MS analysis.

For carbohydrate gel electrophoresis, 6 µg of CS/DS was mixed with 6 µL of Hyal. After overnight incubation and stopping reaction by heating at 95°C, 4 µL of glycerol (50%) and 2 µL of phenol red were added to the reaction mixture.

For size-exclusion chromatography (SEC), 2.5 mg of CS/DS was solubilized in 100 µL of reaction buffer containing 1000 u/mL of Hyal. After overnight incubation at 37°C and stopping reaction by heating, solution was loaded on preparative SEC Biogel column.

### Carbohydrate-polyacrylamide gel electrophoresis

Carbohydrate-polyacrylamide gel electrophoresis (C-PAGE) was performed in polyacrylamide gels (8.3 × 7.3 cm; thickness = 1 mm) composed of acrylamide: bis-acrylamide in a 100 mM Tris-HCl buffer, pH 7.8 at 6% and 27% for stacking and resolving gels, respectively. The total reaction mixtures (6 µg of CS/DS, 1 µL) were loaded into wells. Gels were run in a Mini-PROTEAN® Tetracell system (Bio-Rad) by applying a constant voltage of 250 V for 45 min and using 40 mM Tris, 40 mM acetic acid, pH 7.8 as running buffer. For the sake of sensitive detection, a double staining was performed using Alcian blue and silver nitrate successively, as reported elsewhere (Bodet et al. 2017). At the end of the run, the gel was immersed into Alcian blue solution (0.5%) with 2% of acetic acid for 10 min under moderate stirring conditions. The Alcian blue staining solution was then withdrawn, and the gel was immersed in water for at least 1 h under stirring until appearance of blue stained bands. The gel was



**Fig. 3.** Negative ion mode ESI-Orbitrap spectrum of the CS-C digest. To have a better view of the observed ions, different regions of the spectrum are shown separately as follows: (A)  $m/z$  250–500, (B)  $m/z$  500–750 and (C)  $m/z$  750–1000 ranges. Ions indicated by red stars have been present in the control solution containing only the enzyme without substrate. (D) Absolute intensities of different oligosaccharides observed in the ESI-Orbitrap mass spectrum of the CS-C digest plotted according to their size, taking into account all the charge states for each oligosaccharide. For each individual ion, only the intensity of the monoisotopic peak was counted. Digestion was performed by incubation of 0.2 mg of CS-C with 20  $\mu$ L of Hyal (1000 u/mL) at 37°C overnight. Direct infusion (3  $\mu$ L/min) of the digestion mixture diluted in methanol. This figure is available in black and white in print and in color at *Glycobiology* online.



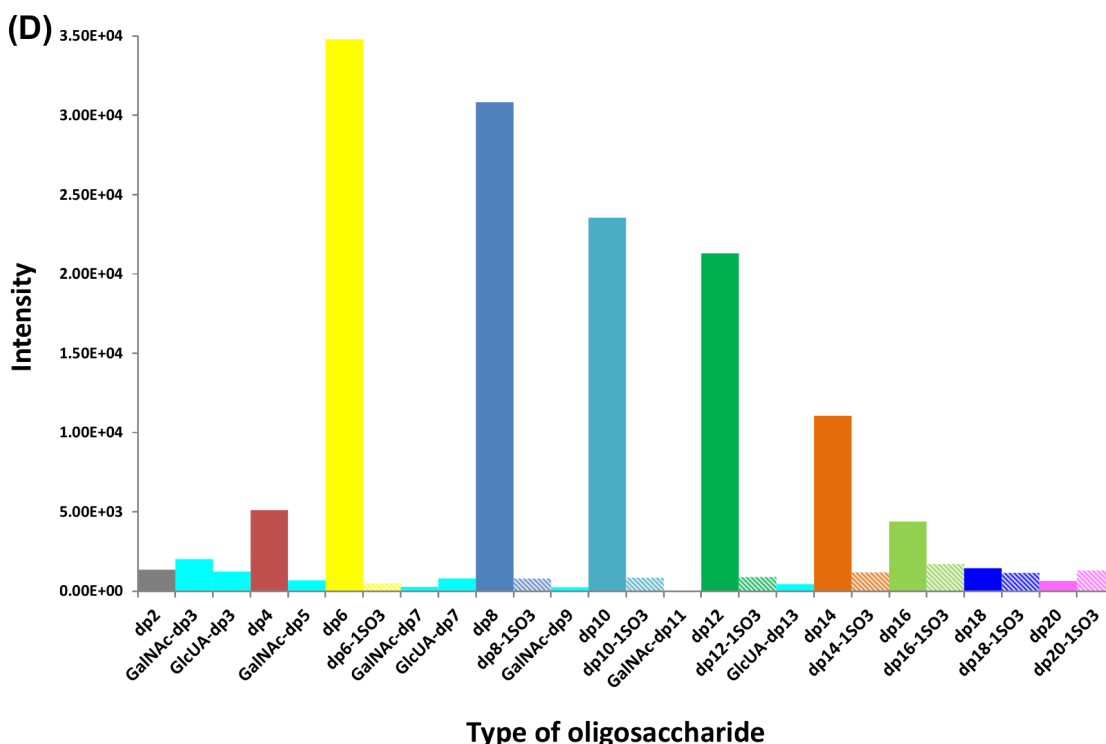


Fig. 3. continued

then immersed in silver nitrate solution (0.4% in water) in complete darkness for 10 min. The gel was then rinsed three times with water before addition of the developing solution composed of 7 g of sodium carbonate and 80  $\mu$ L of formaldehyde diluted in 100 mL water. Once new bands appeared, the developing solution was removed and replaced by acetic acid (5%) to stop the coloration.

### Size-exclusion chromatography

SEC was performed on a Bio-Gel P-10 column (Bio-Rad, Hercules, CA) (85 x 3.5 cm equilibrated with 0.25 M NaCl, and run at 0.35 mL/min. Fractions were collected every 10 min for 24 h with an ISCO 328 fraction collector. Elution was constantly monitored by UV detection at 210 nm with a Merck L-4000 UV detector (range 0.01, medium response). Eluted material consisted of a graded series of size-uniform oligosaccharides from disaccharide (dp2) to dodecasaccharide (dp12). To ensure size homogeneity, only the top peaks of each fraction were pooled and lyophilized before further processing. Isolated dried fractions were desalted by gel filtration on a Superdex 30 Increase 10/300 GL column (GE Healthcare Life sciences, Velizy-Villacoublay, France) using an Äkta UV-900 (Amersham, Buckinghamshire, UK) chromatography system. The Superdex 30 column was equilibrated and run with 0.1 mM NaCl, at 1 mL/min, and elution was monitored by UV detection at 214 nm. Desalted saccharides were finally lyophilized and kept at  $-20^{\circ}\text{C}$  until further analysis.

### ESI-MS and tandem MS analysis

ESI-MS analysis of SEC purified oligosaccharides was performed using a LTQ XL mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA). Freeze-dried oligosaccharides were solubilized in 250  $\mu$ L

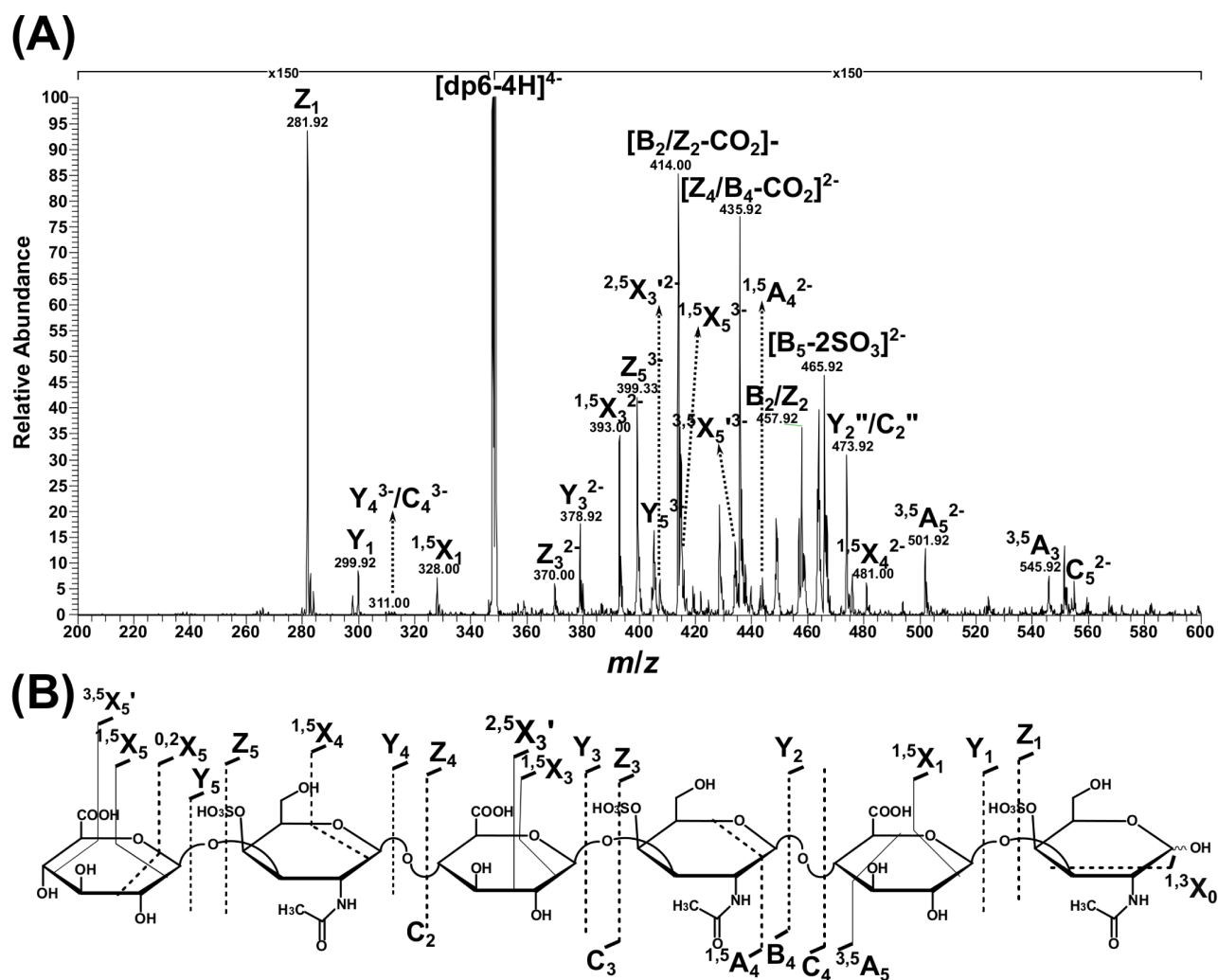
water/methanol 50/50 v/v and infused at 3  $\mu$ L/min flow rate using a syringe pump.

High-resolution MS experiments using a LTQ-XL/Orbitrap hybrid instrument (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA) were carried out to analyze the enzyme reaction mixtures. About 2  $\mu$ L of the digestion solutions were diluted in 1 mL of methanol, and were infused into the ESI source at a flow rate of 3  $\mu$ L/min using a syringe pump. Control solutions were prepared containing either only enzyme (spectrum is not shown) or only polysaccharide, (Supplementary Figure S3).

The auxiliary, and sweep gas flows were set at 0 (arbitrary unit) and the temperature of the drying gas was set at  $275^{\circ}\text{C}$ . Electrospray voltage was set at 3.8 kV, capillary voltage at  $-40$  V and tube lens offset at  $-40$  V. These ion source conditions have been adjusted in a way to minimize in-source fragmentation and at the same time to get reasonable ion intensities.

### XUV photodissociation

XUV photodissociation experiments were performed using XUV radiation delivered by the DISCO beamline at the SOLEIL synchrotron radiation facility (Saint-Aubin, France). A LTQ XL mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA) was on-line connected to the end station of the DISCO beamline (Giuliani et al. 2009). A photon shutter was used to synchronize the photon irradiation with precursor ions trapping. The photon energy was set to 18 eV and the irradiation time was set to 1 s. Precursor ions were isolated with an isolation window of 3 u and the normalized collision energy (NCE) was set to zero to have only XUV activation. For CID mass spectra (using the same mass spectrometer), the photon irradiation was stopped, and fragmentation was achieved by increasing the NCE. Thermo Xcalibur 3.0.63 software was used for analyzing the spectra.



**Fig. 4.** Extreme-UV photodissociation of hexasaccharide SEC fraction of CS-A digestion mixture. (A) Fragmentation spectrum of the isolated ion  $[\text{dp6-4H}]^{4-}$  ( $m/z$  347.8) and (B) XUV cleavage map (without indication of the charge state of fragment ions due to space limitation). Cleavages indicated with plain lines demonstrate the sequence with a GlcUA unit at the nonreducing end (GlcUA-GalNAc(4S)-GlcUA-GalNAc(4S)). Identified fragment ions are summarized in [Supplementary Table S4](#). Digestion conditions as in [Figure 2](#). Direct infusion (3  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) of the digestion mixture diluted in methanol.

## Results and discussion

### Analysis of CS and DS depolymerization by gel electrophoresis, and size-exclusion chromatography

Depolymerization activity of Hyal on CS (CS-A and CS-C) and DS was first assessed by C-PAGE ([Figure 1](#)). The C-PAGE profiles of the CS-A and CS-C digests revealed the disappearance of the bands corresponding to CS-A and CS-C polysaccharides upon incubation with Hyal, indicating the full depolymerization of these substrates. Several bands with similar profiles for both CS-A and CS-C appeared at lower molecular weight range, which were attributed to oligosaccharides issued from depolymerization. By contrast, the DS digestion mixture showed neither modification of the polysaccharide content nor formation of oligosaccharide products, supporting the lack of activity of Hyal on DS, consistent with previous studies ([Kaneiwa et al. 2010](#)).

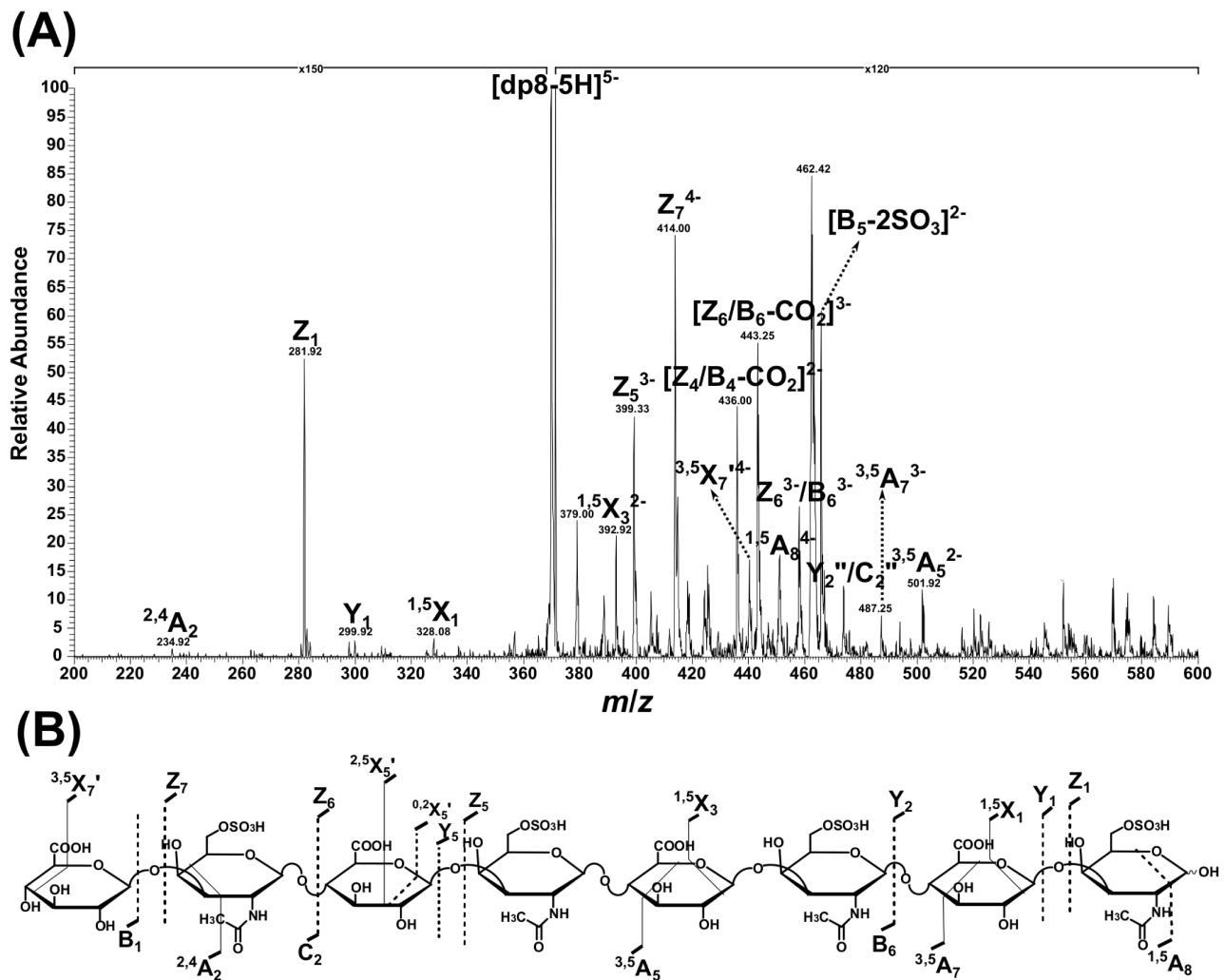
Oligosaccharide products were then separated and purified by SEC. CS-A and CS-C digests yielded similar peak distributions on SEC chromatograms, which were attributed to oligosaccharides

ranging from di- to octadeca-saccharides based on column calibration ([Supplementary Figure S1](#)). By contrast, no such oligosaccharide peaks were detected with DS, and this polysaccharide remained mostly intact as deduced from its detection as a single peak eluted at void volume. Overall, these results from gel electrophoresis and SEC chromatography indicated that compared to DS, CS is the preferred substrate of Hyal.

### Mass spectrometry analysis of the CS/DS depolymerization products

To get further structural insight into the oligosaccharides formed by Hyal, their analysis was carried out by negative ionization ESI-MS. Mass spectra obtained for three example SEC fractions from CS-A and CS-C digests exhibited multicharged ion pattern corresponding to structures with the repeating units (GlcUA-GalNAc) $_n$ , ([Supplementary Figure S2](#)). It is worth noting that the formed oligosaccharides were saturated, consistent with the hydrolase-type mechanism of Hyal. These results confirmed the





**Fig. 5.** Extreme-UV photodissociation of octasaccharide SEC fraction of CS-C digestion mixture. **(A)** Fragmentation spectrum of the isolated ion  $[\text{dp}8\text{-}5\text{H}]^{5-}$  ( $m/z$  369.8) and **(B)** XUV cleavage map (without indication of the charge state of fragment ions due to space limitation). Cleavages indicated with plain lines demonstrate the sequence with a GlcUA unit in the nonreducing end (GlcUA-GalNAc(6S)-GlcUA-GalNAc(6S)-GlcUA-GalNAc(6S)). Identified fragment ions are summarized in [Supplementary Table S5](#). Digestion conditions as in [Figure 2](#). Direct infusion (3  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) of the digestion mixture diluted in methanol.

depolymerization of CS, sulfated on either C4 (CS-A) or C6 (CS-C), into even-numbered oligosaccharides.

To achieve a comprehensive structural identification of the enzyme products, the reaction mixtures from CS and DS digests were also directly analyzed by high-resolution ESI-MS on LTQ Orbitrap. The mass spectra of the CS-A digest showed ion distributions (theoretical and experimental  $m/z$  values of all the identified ions along with their absolute intensities are reported in [Supplementary Table S1](#)) mainly attributed to (GlcUA-GalNAcS)-based oligosaccharides ranging from dp2 to dp18 ([Figure 2](#)), i.e. consistent with SEC result but a larger range than observed by C-PAGE likely due to the lower sensitivity of gel staining.

In order to have a better insight into the formation of CS oligosaccharides by Hyal, the absolute intensities of corresponding ions have been plotted according to their size, taking into account all the charge states for each oligosaccharide ([Figure 2d](#)). Based on this signal quantification, the major decomposition products of CS-A by Hyal are dp4, dp6, dp8, dp10 and dp12 with a marked prevalence of hexasaccharide (dp6), which represented more than

40% of the detected oligosaccharides. Relative abundances of various oligosaccharides are not totally consistent with their corresponding peak areas in size exclusion chromatogram that is most probably due to the dissimilar ionization and transportation efficiency of different oligosaccharides or space charge effects. The presence of oligosaccharides containing one or two sulfate less than the intact oligosaccharides was also detected in small amount, with their relative abundances increasing with the oligosaccharide size. This observation may be due either to some undersulfated sequences in the polysaccharide substrate, or to the loss of sulfate upon the MS ionization process. It should be mentioned that minor saturated odd-numbered oligosaccharides (dp3 to dp13) were also detected in addition to the even-numbered oligosaccharides, but at lower signal intensity. These odd oligosaccharides could result either from in-source fragmentation of even-numbered oligosaccharides or from the enzyme activity. We assume they resulted from Hyal activity since we observed small peaks interspersed between the major even-numbered oligosaccharide peaks on SEC chromatogram, which likely correspond to odd oligosaccharides. Formation of

odd-numbered oligosaccharides from hyaluronan by leech and bovine teste hyaluronidases has been reported recently (He et al. 2020). Unlike even oligosaccharides, they have identical reducing and nonreducing ends, either a GlcUA residue or a GalNAc(4S) residue as determined by high-resolution ESI-Orbitrap analysis, as for example the pentasaccharides GlcUA-GalNAc(4S)-GlcUA-GalNAc(4S)-GlcUA (annotated as GlcUA-dp5 in Figure 2) and GalNAc(4S)-GlcUA-GalNAc(4S)-GlcUA-GalNAc(4S) (annotated as GalNAc-dp5 in Figure 2). CS-A odd oligosaccharides with GalNAc(4S) unit at the reducing and nonreducing ends are more dominant in the spectrum.

Mass spectrum of the CS-C digest exhibited comparable ions species attributed to (GlcUA-GalNAcS)-based oligosaccharides ranging from dp2 to dp20 (Figure 3,  $m/z$  values of all the identified ions along with their absolute intensities are reported in Supplementary Table S2). The major formed oligosaccharides are as follows: dp4, dp6, dp8, dp10, dp12, dp14 and dp16. However, their distribution according to signal intensity showed difference with CS-A (Figure 3). Although dp6 is again the dominant formed oligosaccharide, the contribution of longer oligosaccharides is significantly higher than in CS-A digest. This difference in the size distribution of oligosaccharides produced by Hyal from CS-A and CS-C polysaccharides could be qualitatively observed from their respective mass spectra, but not from their corresponding C-PAGE profiles. As observed in CS-A digest, odd-numbered oligosaccharides of low intensity, and oligosaccharides with sulfate loss were clearly detected in the spectrum of CS-C digest. These results demonstrate that both CS-A and CS-C polysaccharides are substrate of Hyal, albeit with difference in the size distribution of formed oligosaccharides.

The DS/Hyal reaction mixture was also analyzed by ESI-MS despite the lack of oligosaccharides detected by C-PAGE and SEC upon incubation of DS with Hyal. Mass spectrum showed ions of very low intensity, which were attributed to (GlcUA-GalNAcS)-based oligosaccharides ranging in size from dp4 to dp12 (Supplementary Figure S4,  $m/z$  values of all the identified ions along with their absolute intensities in Supplementary Table S3). However, a control incubation of pure DS dodecasaccharide with Hyal failed to evidence any oligosaccharide ions on mass spectrum (Supplementary Figure S5), suggesting that (GlcUA-GalNAcS)-based oligosaccharides detected in dermatan digest arose from either DS oligosaccharides initially present in DS polysaccharide preparation or from CS contaminant.

It has to be emphasized that direct comparison of the absolute MS intensities of individual ions between CS digests is not legitimate, because in each digest, different kinds of ions with dissimilar concentrations exist which influences on the ionization efficiency and ion suppression effects. However, the relative intensities of ions in each digest gives reliable information about the enzymatic activity of the Hyal on a given polysaccharide. Based on the high-resolution ESI-MS experiments, it can be concluded that CS-A and CS-C, but not CS-B, are depolymerized by Hyal, but they produced dissimilar distribution of oligosaccharides. At this stage, it must be noted that MS analysis alone cannot ascertain the sequence of formed oligosaccharides, which were determined by tandem MS using XUV activation presented in the next section.

### XUV photodissociation tandem mass spectrometry analysis

Compared to usual collisional dissociation methods, which lead to limited informative fragmentation in carbohydrate analysis, the recently emerged XUV photodissociation appears as an attractive

activation technique (Giuliani et al. 2018). Indeed, XUV photodissociation applied to the structural characterization of various sugars has been reported to provide structurally informative cross ring cleavage ions (Ropartz et al. 2014, 2015). XUV photodissociation tandem MS of CS oligosaccharides confirmed the greater cross-ring fragmentation obtained in a single MS/MS step as compared to CID experiments in which fragment ions resulted mainly from glycosidic bond cleavages (CID fragments from the CS-A hexasaccharide ion  $[\text{dp6-4H}]^{4+}$  and CS-C octasaccharide ion  $[\text{dp8-5H}]^{5-}$  are in Supplementary Tables S6 and S7 and corresponding mass spectra in Supplementary Figures S6 and S7, respectively). Figures 4 and 5 present the XUV fragmentation spectra of CS-A hexasaccharide and CS-C octasaccharide as two representative examples, and their respective cleavage maps for the selected ions  $[\text{dp6-4H}]^{4+}$  and  $[\text{dp8-5H}]^{5-}$ . All the identified fragment ions have been listed in Supplementary Tables S4 and S5. In the fragment ion map of Figure 4, cleavages such as  $^{3,5}\text{A}_5^{2-}$ ,  $^{1,5}\text{X}_1$ ,  $^{1,5}\text{X}_3^{2-}$ ,  $^{2,5}\text{X}_3^{2-}$ ,  $^{1,5}\text{X}_5^{3-}$  and  $^{3,5}\text{X}_5^{3-}$  from CS-A dp6 (plain lines in the cleavage map Figure 4, Domon and Costello nomenclature – Domon and Costello 1988), demonstrate that Hyal cleaves the  $\beta(1 \rightarrow 4)$  linkage, resulting in GlcUA residue at the nonreducing end of the formed oligosaccharide. Similarly,  $^{2,4}\text{A}_2$ ,  $^{3,5}\text{A}_5^{2-}$ ,  $^{3,5}\text{A}_7^{3-}$ ,  $^{1,5}\text{X}_1$ ,  $^{1,5}\text{X}_3^{2-}$ ,  $^{2,5}\text{X}_5^{3-}$  and  $^{3,5}\text{X}_7^{4-}$  cleavages from CS-C dp8 (Figure 5) confirm the presence of GlcUA at the nonreducing end of the  $[\text{dp8-5H}]^{5-}$  ion. The specific cleavage of  $\beta(1 \rightarrow 4)$  linkage by Hyal has been previously explained for HA degradation as a result of either the helical structure of HA with exposed  $\beta(1 \rightarrow 4)$  bonds or the larger conformational flexibility of  $\beta(1 \rightarrow 4)$  linkage compared to  $\beta(1 \rightarrow 3)$  bond (Stern and Jedrzejak 2006). The XUV fragmentation spectra showed preservation of the sulfate groups in fragment ions similarly to VUPD experiments (Klein et al. 2019), which is useful to the determination of the sulfate group location, and consistently indicating sulfation on C4 and C6 of GalNAc residues of oligosaccharides from CS-A and CS-C digests, respectively.

### Conclusions

In this study, we have investigated the activity of the mammal Hyal on CS polysaccharides. Although the different CS-A and CS-C polysaccharides exhibit similar degradation pattern upon the action of Hyal in C-PAGE and SEC separations, the exact mass measurements by MS analysis showed different distribution of depolymerization products according to the sulfate position, the CS-C (4-O-sulfated) digestion mixture containing a higher abundance of longer oligosaccharides such as dp10 and dp12. The ability of Hyal to produce hexa- and higher oligosaccharides makes it a valuable tool for the structural analysis of GAGs. In addition, the exact mass measurements evidenced the formation of odd-numbered oligosaccharides in low amount. No Hyal activity was detected on DS, confirming that the C5 epimerization of the GlcUA into IdoA residue is an obstacle to the activity of hyaluronidase. One can assume that the C5 epimerization alters the recognition of the uronic residue at the Hyal active site or that it may modify the exposition of the nearby the  $\beta(1 \rightarrow 4)$  glycosidic bond. Finally, XUV photodissociation experiments performed for the first time on GAGs, established the sequence and sulfate pattern of CS oligosaccharides formed by Hyal, and extended to the CS polysaccharides family the cleavage specificity of Hyal for the  $\beta(1 \rightarrow 4)$  glycosidic bond. Overall, these results support the role of the secreted mammal Hyal in the early catabolism of CS anchored to membrane proteoglycans and in extra-cellular matrix (Farrugia et al. 2019). Its endopolysaccharidase activity produce CS oligosaccharides of polymerization degree range compatible with

subsequent degradation by CS specific exohydrolases and sulfatases in cellular lysosomes.

## Supplementary data

Supplementary data for this article are available online at <http://glycob.oxfordjournals.org/>.

## Acknowledgments

We are grateful to the staff from SOLEIL for the smooth running of the facility and for providing beamtime (Proposal numbers: 20181382 and 20191661). M.B. acknowledges Ph.D. fellowship from doctoral school SDSV (N°577, Université Paris-Saclay), P.B. acknowledges post-doctoral fellowship from the program CHARMMAT ANR-11-LABX-0039 grant supported by the French National Research Agency.

## Conflict of interest statement

None declared.

## References

- Agyekum I *et al.* 2015. Assignment of hexuronic acid stereochemistry in synthetic heparan sulfate tetrasaccharides with 2-O-sulfo uronic acids using electron detachment dissociation. *Int J Mass Spectrom.* 390:163–169. doi: 10.1016/j.ijms.2015.08.018.
- Bayat P, Lesage D, Cole RB. 2020. Tutorial: Ion activation in tandem mass spectrometry using ultra-high resolution instrumentation. *Mass Spectrom Rev.* 39(5–6):680–702. doi: 10.1002/mas.21623.
- Bodet PE *et al.* 2017. Efficient recovery of glycosaminoglycan oligosaccharides from polyacrylamide gel electrophoresis combined with mass spectrometry analysis. *Anal Bioanal Chem.* 409(5):1257–1269. doi: 10.1007/s00216-016-0052-5.
- Chi L, Amster J, Linhardt R. 2005. Mass spectrometry for the analysis of highly charged sulfated carbohydrates. *Curr Anal Chem.* 1(3):223–240.
- Csoka AB, Frost GI, Stern R. 2001. The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes. *Matrix Biol.* 20(8):499–508.
- Domon B, Costello CE. 1988. A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates. *Glycoconj J.* 5(4):397–409. <http://link.springer.com/10.1007/BF01049915> (7 July 2017).
- Farrugia BL *et al.* 2019. Hyaluronidase-4 is produced by mast cells and can cleave serglycin chondroitin sulfate chains into lower molecular weight forms. *J Biol Chem.* 294:11458–11472.
- Giuliani A *et al.* 2009. DISCO: A low-energy multipurpose beamline at synchrotron SOLEIL. *J Synchrotron Radiat.* 16(6):835–841. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1107/S0909049509034049>.
- Giuliani A, Williams JP, Green MR. 2018. Extreme ultraviolet radiation: A means of ion activation for tandem mass spectrometry. *Anal Chem.* 90(12):7176–7180.
- He J *et al.* 2020. SI-construction of saturated odd- and even-numbered hyaluronan oligosaccharide building block library. *Carbohydr Polym.* 231(86):1–13. doi: 10.1016/j.carbpol.2019.115700.
- Honda T *et al.* 2012. Hyaluronidases have strong hydrolytic activity toward chondroitin 4-sulfate comparable to that for hyaluronan. *Biomolecules.* 2(4):549–563.
- Jackson RL, Busch SJ, Cardin AD. 1991. Glycosaminoglycans: Molecular properties, protein interactions, and role in physiological processes. *Physiol Rev.* 71(2):481–539.
- Kailemia MJ *et al.* 2014. High-field asymmetric-waveform ion mobility spectrometry and electron detachment dissociation of isobaric mixtures of glycosaminoglycans. *J Am Soc Mass Spectrom.* 25:258–268.
- Kaneiwa T, Mizumoto S, Sugahara K, Yamada S. 2010. Identification of human hyaluronidase-4 as a novel chondroitin sulfate hydrolase that preferentially cleaves the galactosaminidic linkage in the trisulfated tetrasaccharide sequence. *Glycobiology.* 20(3):300–309.
- Klein DR, Leach FE, Jonathan Amster I, Brodbelt JS. 2019. Structural characterization of glycosaminoglycan carbohydrates using ultraviolet photodissociation. *Anal Chem.* 91(9):6019–6026.
- Kubaski F *et al.* 2017. Glycosaminoglycans detection methods: Applications of mass spectrometry. *Mol Genet Metab.* 120(1–2):67–77. doi: 10.1016/j.ymgme.2016.09.005.
- Laremore TN *et al.* 2009. Recent progress and applications in glycosaminoglycan and heparin research. *Curr Opin Chem Biol.* 13(5–6):633–640.
- Leach FE, Xiao Z *et al.* 2011. Electron detachment dissociation and infrared multiphoton dissociation of heparin tetrasaccharides. *Int J Mass Spectrom.* 308(2–3):253–259.
- Leach FE, Wolff JJ *et al.* 2011. Negative electron transfer dissociation Fourier transform mass spectrometry of glycosaminoglycan carbohydrates. *Eur J Mass Spectrom.* 17(2):167–176. <http://journals.sagepub.com/doi/10.1255/ejms.1120> 26 March 2020.
- Leach FE, Arungundram S *et al.* 2012. Electron detachment dissociation of synthetic heparan sulfate glycosaminoglycan tetrasaccharides varying in degree of sulfation and hexuronic acid stereochemistry. *Int J Mass Spectrom.* 330–332:152–159. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1387380612002242>.
- Leach FE, Ly M *et al.* 2012. SI\_hexuronic acid stereochemistry determination in chondroitin sulfate glycosaminoglycan oligosaccharides by electron detachment dissociation. *J Am Soc Mass Spectrom.* 23(9):2–5.
- Leach FE *et al.* 2017. Negative electron transfer dissociation sequencing of increasingly sulfated glycosaminoglycan oligosaccharides on an orbitrap mass spectrometer. *J Am Soc Mass Spectrom.* 28(9):1844–1854.
- Lettow M *et al.* 2020. IR action spectroscopy of glycosaminoglycan oligosaccharides. *Anal Bioanal Chem.* 412(3):533–537.
- Ly M *et al.* 2011. The proteoglycan bikunin has a defined sequence. *Nat Chem Biol.* 7(11):827–833.
- Meyer K, Rapport MM. 1952. Hyaluronidases. *Adv Enzymol Relat Subj Biochem.* 13:199–236.
- Minsky BB *et al.* 2018. Mass spectrometry reveals a multifaceted role of glycosaminoglycan chains in factor Xa inactivation by antithrombin. *Biochemistry.* 57(32):4880–4890.
- Naggar EF, Costello CE, Zaia J. 2004. Competing fragmentation processes in tandem mass spectra of heparin-like glycosaminoglycans. *J Am Soc Mass Spectrom.* 15(11):1534–1544.
- Necas J, Bartosikova L, Brauner P, Kolar J. 2008. Hyaluronic acid (Hyaluronan): A review. *Vet Med.* 53(8):397–411.
- Pepi LE, Sanderson P, Stickney M, Amster IJ. 2020. Developments in mass spectrometry for glycosaminoglycan analysis: A review. *Mol Cell Proteomics.* mcp.R120.002267. In Press Accepted Manuscript, Online ahead of print. doi: 10.1074/mcp.R120.002267.
- Racaud A *et al.* 2009. Wavelength-tunable ultraviolet photodissociation (UVPD) of heparin-derived disaccharides in a linear ion trap. *J Am Soc Mass Spectrom.* 20(9):1645–1651. doi: 10.1016/j.jasms.2009.04.022 (July 8, 2019).
- Ropartz D *et al.* 2014. Deciphering the structure of isomeric oligosaccharides in a complex mixture by tandem mass spectrometry: Photon activation with vacuum ultra-violet brings unique information and enables definitive structure assignment. *Anal Chim Acta.* 807:84–95.
- Ropartz D *et al.* 2015. High-energy photon activation tandem mass spectrometry provides unprecedented insights into the structure of highly sulfated oligosaccharides extracted from macroalgal cell walls. *Anal Chem.* 87(2):1042–1049.
- Schiller J *et al.* 1999. Cartilage degradation by hyaluronate lyase and chondroitin ABC Lyase: A MALDI-TOF mass spectrometric study. *Carbohydr Res.* 318(1–4):116–122.
- Schiller J, Arnold J, Sonntag K, Arnold K. 1996. NMR studies on human, pathologically changed synovial fluids: Role of hypochlorous acid. *Magn Reson Med.* 35(6):848–853. <http://doi.wiley.com/10.1002/mrm.1910350610> (8 April 2020).

- Schindler B *et al.* 2017. IRMPD spectroscopy sheds new (infrared) light on the sulfate pattern of carbohydrates. *J Phys Chem A*. 121(10):2114–2120.
- Solakylidirim K. 2019. Recent advances in glycosaminoglycan analysis by various mass spectrometry techniques. *Anal Bioanal Chem*. 411: 3731–3741.
- Stern R. 2003. Devising a pathway for hyaluronan catabolism: Are we there yet? *Glycobiology*. 13(12):105–115.
- Stern R, Jedrzejewski MJ. 2006. Hyaluronidases: Their genomics, structures, and mechanisms of action. *Chem Rev*. 106(3):818–839.
- Sugahara K *et al.* 2003. Recent advances in the structural biology of chondroitin sulfate and dermatan sulfate. *Curr Opin Struct Biol*. 13(5):612–620.
- Takagaki K *et al.* 1994. Characterization of hydrolysis and transglycosylation by testicular hyaluronidase using ion-spray mass spectrometry. *Biochemistry*. 33(21):6503–6507.
- Wang W, Wang J, Li F. 2016. Hyaluronidase and chondroitinase. In: Atassi M. (eds) *Protein Reviews. Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 13. Singapore: Springer. [https://doi.org/10.1007/5584\\_2016\\_54](https://doi.org/10.1007/5584_2016_54).
- Wei J *et al.* 2019. Characterization and quantification of highly sulfated glycosaminoglycan isomers by gated-trapped ion mobility spectrometry negative electron transfer dissociation ms/ms. *Anal Chem*. 91(4):2994–3001.
- Wolff JJ *et al.* 2008a. Electron detachment dissociation of dermatan sulfate oligosaccharides. *J Am Soc Mass Spectrom*. 19(2):294–304. <http://link.springer.com/10.1016/j.jasms.2007.10.007> (4 July 2019).
- Wolff JJ *et al.* 2008b. Influence of charge state and sodium cationization on the electron detachment dissociation and infrared multiphoton dissociation of glycosaminoglycan oligosaccharides. *J Am Soc Mass Spectrom*. 19(6):790–798.
- Wolff JJ *et al.* 2010. Negative electron transfer dissociation of glycosaminoglycans. *Anal Chem*. 82(9):3460–3466. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac100554a> (7 July 2019).
- Wolff JJ, Chi L, Linhardt RJ, Amster IJ. 2007. Distinguishing glucuronic from iduronic acid in glycosaminoglycan tetrasaccharides by using electron detachment dissociation. *Anal Chem*. 79(5):2015–2022. <https://pubs-acsc-org.ezproxy.universite-paris-saclay.fr/doi/abs/10.1021/ac061636x> (7 July 2019).
- Wu J *et al.* 2018. Negative electron transfer dissociation sequencing of 3-O-sulfation-containing heparan sulfate oligosaccharides. *J Am Soc Mass Spectrom*. 29(6):1262–1272.
- Yamada S. 2012. Chondroitin sulfate-specific novel hydrolase in human. In: Sudhakaran P, Suroliya A, editors. *Advances in experimental medicine and biology*. New York, NY: Springer. p. 47–56.
- Yamada S. 2015. *Role of hyaluronidases in the catabolism of chondroitin sulfate*. In *advances in experimental medicine and biology*. Springer New York: LLC. p. 185–197.
- Zaia J, McClellan JE, Costello CE. 2001. Tandem mass spectrometric determination of the 4S/6S sulfation sequence in chondroitin sulfate oligosaccharides. *Anal Chem*. 73(24):6030–6039.
- Zaia J. 2013. Glycosaminoglycan glycomics using mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*. 12(4):885–892.
- Zaia J, Costello CE. 2003. Tandem mass spectrometry of sulfated heparin-like glycosaminoglycan oligosaccharides. *Anal Chem*. 75(10):2445–2455.
- Zaia J, Li XQ, Chan SY, Costello CE. 2003. Tandem mass spectrometric strategies for determination of sulfation positions and uronic acid epimerization in chondroitin sulfate oligosaccharides. *J Am Soc Mass Spectrom*. 14(11):1270–1281.



**Titre :** Caractérisation protéomique et fonctionnelle de la 6-O-endosulfatase humaine HSulf-2

**Mots clés :** Sulfatase, Glycosaminoglycane, Spectrométrie de masse, Modifications post-traductionnelles

**Résumé :** L'endosulfatase humaine HSulf-2 catalyse la 6-O-désulfatation du glycosaminoglycane héparane sulfate (HS) présent à la surface cellulaire. Les propriétés d'interaction de HS sont ainsi finement régulées par son profil de sulfatation. HSulf-2 est synthétisée sous forme d'une protéine qui devient mature après clivage par la furine. Elle présente une organisation moléculaire constituée de deux chaînes reliées vraisemblablement par des ponts disulfures. Un domaine hydrophile (HD) débordant sur les deux chaînes et propre à ces endosulfatases constitue une structure de reconnaissance du substrat. L'organisation de HSulf-2 résultant d'un repliement des deux chaînes reste à déterminer. Les objectifs de ce travail visent à la fois à caractériser la structure, et à déterminer son influence sur l'activité catalytique de HSulf-2. Par des approches biochimiques et biophysiques telles que la spectrométrie de masse et la RMN, nous avons

identifié pour la première fois les positions et structures des modifications post-traductionnelles présentes sur HSulf-2. Ainsi 5 N-glycanes ont été caractérisés et 10 cystéines impliquées dans des ponts disulfure ont été identifiées. Nous avons en outre caractérisé une modification post-traductionnelle unique qui est une chaîne de glycosaminoglycane de type chondroïtine sulfate. Nous avons également étudié le rôle de cette chaîne qui semble réguler l'activité de HSulf-2. Les résultats obtenus ouvrent des voies de compréhension sur cet important mécanisme de régulation de l'activité de HS. Par ailleurs, ils devraient établir les bases structurales pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques ciblant les HSulfs, notamment par la conception d'inhibiteurs spécifiques.

**Title :** Proteomic and functional characterization of the human 6-O-endosulfatase HSulf-2

**Keywords :** Sulfatase, Glycosaminoglycan, Mass Spectrometry, Post-translational modifications

**Abstract :** The Human endosulfatase HSulf-2 catalyzes the 6-O-desulfation of heparan sulfate (HS) glycosaminoglycan present on the cell surface. The interaction properties of HS are thus finely regulated by its sulfation profile. HSulf-2 is synthesized as a protein which matures after cleavage by furin. It has a molecular organization made up of two chains probably linked by disulfide bridges. A hydrophilic domain (HD) overflowing on the two chains and specific to these endosulfatases constitutes a recognition structure of the substrate. The organization of HSulf-2 resulting from a folding of the two chains remains to be determined. The objectives of this work aim both to characterize the structure, and to determine its influence on HSulf-2 catalytic activity. By biochemical and biophysical

approaches such as mass spectrometry and NMR we have identified for the first time the positions and structures of posttranslational modifications present on HSulf-2. Thus, 5 N-glycans have been characterized and 10 cysteines involved in disulfide bridges have been identified. We further characterized a unique posttranslational modification, which is a chondroitin sulfate-type glycosaminoglycan chain. We have also studied the role of this chain that seems to act like an activity regulator for HSulf-2. The results obtained should increase the comprehension of this important mechanism for regulating HS activity. In addition, they should establish the structural bases for the development of new therapeutic approaches targeting HSulfs, in particular by the design of specific inhibitors.